

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA BOSCHECO MORETONI

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA
E HIPOGLICEMIANTE DOS FRUTOS DE *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**

**CURITIBA
2008**

CLAUDIA BOSCHECO MORETONI

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA
E HIPOGLICEMIANTE DOS FRUTOS DE *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima

CURITIBA

2008 NOTA BIOGRÁFICA

A autora é Farmacêutica, com habilitação em indústria, graduada pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) em 2004. Durante a graduação, foi bolsista do Programa de Ensino Tutorial (PET) de Farmácia da UFPR, por meio do qual desenvolveu diversas atividades de ensino, pesquisa e extensão. Em 2001, foi voluntária em iniciação científica no Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Farmácia da UFPR, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima, participando do projeto de pesquisa intitulado “Obtenção e caracterização química de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas”. Em 2003, foi voluntária em iniciação científica no Departamento de Farmacologia da UFPR, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, realizando atividades de pesquisa no projeto “Efeitos dos antiinflamatórios no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina”. No período de 2003 a 2005, cursou e concluiu sua especialização em Atenção Farmacêutica pela UFPR, defendendo a monografia intitulada “O marketing da atenção farmacêutica e serviços farmacêuticos especializados”, sob orientação do Prof. M.Sc. Cassyano Januário Correr. Iniciou sua carreira profissional como Farmacêutica responsável pela implantação e desenvolvimento do Programa de Atenção Farmacêutica da “Apparenza Laboratório de Manipulações”, em Curitiba/PR. Entre 2003 e 2006, participou dos projetos de pesquisa denominados “Avaliação de testes de medida da adesão terapêutica e dos resultados terapêuticos” e “Análise dos resultados da atenção farmacêutica em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2”, coordenados pelo Prof. M.Sc. Cassyano Januário Correr. Em 2006, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos – Produtos Naturais como bolsista CAPES, onde desenvolveu o projeto sobre a “Avaliação fitoquímica e das atividades antioxidante, citotóxica e hipoglicemiante dos frutos de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)”, cujos resultados estão apresentados nesta dissertação de mestrado.

*Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam na ciência e na educação como
o caminho para dias melhores.*

**Sandra e Sérgio, meus pais
Anderson, meu marido**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênção e proteção.

A UFPR pela oportunidade e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela realização.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Sandra e Sérgio, meus pais, sábios em sua essência, pela dedicação e pelos ensinamentos de amor, perseverança, humildade e caráter.

Ao meu marido, Anderson, pelo apoio, incentivo e carinho.

A Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima, orientadora, madrinha, amiga e exemplo.

Prof^o. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, co-orientador deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Sandra Mara Woranovicz Barreira, colaboradora e especialmente amiga.

Ao Prof^o M.Sc. Antônio Waldir Cunha da Silva do Departamento de Medicina Veterinária e M.Sc. Ernesto Krüger, do Laboratório Marcos Enrietti (Curitiba, PR).

Ao Dr. Marcelo Ribani, do TECPAR, pela contribuição na parte experimental.

Prof. João Carlos Possamai pelo auxílio na análise estatística.

A Hilda Aparecida Santos, amiga majestosamente especial.

Aos alunos de Iniciação Científica Fábio Branco, Thiago de Mari, Ísis Rosa Cesar Bruno e Reinaldo Tanita, pela inestimável ajuda, respeito, confiança e amizade.

Às colegas e Professores do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A Farmacêutica Helga Maria Franke, amiga e incentivadora do sempre caminhar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia.

Aos meus amigos, por tornarem todos os momentos mais fáceis e divertidos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha evolução pessoal e profissional.

*Quando a próxima tarefa é uma montanha a sua frente,
ela pode parecer muito difícil de se escalar.
Mas, você não precisa escalá-la de uma só vez...
Dê um pequeno passo...
E dê mais um pequeno passo...
E, mais um... E então, outro...
E você descobrirá que a tarefa,
que era uma montanha a sua frente,
é apenas uma montanha que você já escalou!*

Ashley Rice

RESUMO

Mudanças na qualidade de vida, a possibilidade de severas complicações e a necessidade do auto-cuidado são fatores que têm motivado os pacientes portadores de *Diabetes mellitus* a buscarem e utilizarem terapias complementares, como as plantas medicinais. A espécie *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae), popularmente conhecida como maxixe, é um dos recursos naturais que tem sido utilizado pela população como terapia complementar para *diabetes*, mas que possui estudos restritos a seu respeito. Este trabalho teve por objetivo avaliar a composição fitoquímica e investigar as atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* do extrato de *C. anguria*, enfatizando as atividades citotóxica, antioxidante e hipoglicemiante, a partir do extrato aquoso, conforme utilização popular (320 mg.mL⁻¹). Os resultados obtidos indicam, por meio de uma abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico a presença de diferentes metabólitos, como heterosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, e do extrato aquoso os taninos e aminogrupos. Foi detectada a presença de elementos-traço e polissacarídeos. O extrato aquoso, de uso popular, não se mostrou citotóxico, mas com discreta atividade antioxidante e considerável atividade hipoglicemiante aguda. Os resultados verificados comprovam o uso popular das atividades biológicas e de composição fitoquímica de *Cucumis anguria*.

Palavras-chaves: *Cucumis anguria* L.; Cucurbitaceae; fitoquímica; antioxidante; citotoxicidade; *Diabetes*.

ABSTRACT

Changes in quality of life, risk of severe complications and require of self-care have been archived as the main features that contribute to the patients with *Diabetes* for use complementary therapies, as herbal medicines. *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae) – usually know as maxixe – has been used as a tradicional plant for Diabetes. However few reports have been available concerned with scientific data about this species. The aim of this work was to study the phytochemical composition of *C. anguria* from a previously obtained hydroalcoholic extract. Moreover, an evaluation of the cytotoxic, antioxidant and hypoglycemic activities of the aqueous extract (320 mg.mL⁻¹) from *C. anguria* as popularly used was performed. The chemical screening showed the presence of different secondary metabolites as flavonoid heterosides, steroids and/or triterpenos, tannins and aminogroups. Also trace elements and polysaccharides were detected. The traditionally used aqueous extract achieved no cytotoxic effects, a low antioxidant activity and a substantial activity in acute hyperglycemia. These results support wide-spread popular information about the antidiabetic properties of *Cucumis anguria* as an herbal medicine.

Key-words: *Cucumis anguria* L.; Cucurbitaceae; phytochemistry; antioxidant; cytotoxicity; *Diabetes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUELETO CUCURBITANO.....	20
FIGURA 2 - ASPECTO VEGETATIVO DE <i>Cucumis anguria</i> L.....	23
FIGURA 3 - FRUTO INTEIRO, EM CORTE TRANSVERSAL E LONGITUDINAL DE <i>Cucumis anguria</i> L.....	23
FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.....	26
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO ÁCIDO FÊNICO, COMPOSTOS FENÓLICOS.....	27
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS β ESTIMULADAS POR GLUCOSE E AMINOÁCIDOS.....	33
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES.....	43
FIGURA 8 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO FLAVONÓIDE-ALUMÍNIO, EM SOLUÇÃO METANÓLICA DE CLORETO DE ALUMÍNIO.....	44
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	49
FIGURA 10 - ASPECTO DAS FRAÇÕES EF03 E EF04, LIOFILIZADAS.....	51
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	53
FIGURA 12 - MECANISMO DE DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	55
FIGURA 13 - CURVA ANALÍTICA PARA A SUBSTÂNCIA PADRÃO RUTINA, NO DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES	67
FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA PARA A SUBSTÂNCIA PADRÃO ÁCIDO GÁLICO, NO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	68
FIGURA 15 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DO FRUTO DE MAXIXE, EM MATURAÇÃO USUAL PARA CONSUMO	72
FIGURA 16 - CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH• PELO EXTRATO AQUOSO ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) DE MAXIXE, EXTRAÍDO À TEMPERATURA AMBIENTE	76
FIGURA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR%) <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE MAXIXE EM mg.mL^{-1}	78
FIGURA 18 - RESPOSTA DO CRESCIMENTO CELULAR EM PRESENÇA DE EXTRATO AQUOSO DE MAXIXE A 20% (V/V).....	79
FIGURA 19 - PORCENTAGEM DE REDUÇÃO NA GLICEMIA DE ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO DE <i>C. anguria</i> NAS CONCENTRAÇÕES DE 320 e $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	POTENCIAL TERAPÊUTICO DO CROMO, MAGNÉSIO, SELÊNIO, VANÁDIO E ZINCO.....	39
TABELA 2 -	INGESTÃO DIETÉTICA DE REFERÊNCIA: MÉDIA ESTIMADA PARA GRUPOS.....	39
TABELA 3 -	DADOS TÉCNICOS PARA ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS NO EQUIPAMENTO DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	57
TABELA 4 -	ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE HETEROSÍDEOS FLAVÔNICOS.....	64
TABELA 5 -	ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENOS.....	65
TABELA 6 -	ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS.....	66
TABELA 7 -	QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS AQUOSOS DE MAXIXE (200 mg.mL ⁻¹).....	67
TABELA 8 -	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE MAXIXE (200 mg.mL ⁻¹).....	69
TABELA 9 -	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES RESULTANTES DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Cucumis anguria</i> L.....	70
TABELA 10 -	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS PURIFICADOS POR SOLUÇÃO DE FEHLING.....	71
TABELA 11 -	AMINOÁCIDOS PRESENTES EM FRUTOS DE MAXIXE.....	73
TABELA 12 -	RESULTADOS PARCIAIS DOS ELEMENTOS-TRAÇO PRESENTES EM <i>C. anguria</i>	74
TABELA 13 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR _%) DO EXTRATO DE MAXIXE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	77

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

λ	comprimento de onda
λ_{max}	comprimento de onda máximo
%	por cento
α	alfa
β	beta
δ	gama
$\delta\Psi_m$	hiperpolarização da membrana mitocondrial
$\delta\Psi_c$	despolarização da membrana celular
μL	microlitro
μg	micrograma
μm	micrometro
$\mu\text{mol.g}^{-1}$	micromolar por grama
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$^{\circ}\text{GL}$	graus Gay-Lussac
aa	aminoácido
AA	ácido ascórbico
Abs	absorvância
AE	acetato de etila
ACN	acetonitrila
AQ	aquoso(a)
AlCl_3	cloreto de alumínio
ATP	trifosfato de adenosina
BM	banho-maria
Ca^{2+}	íon cálcio
CCD	cromatografia em camada delgada
CHCl_3	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
CO_2	gás carbônico
CoQ10	Coenzima Q10
Cucs	Cucurbitacinas
DCM	diclorometano
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	Ácido desoxiribonucléico
D.O.	densidade óptica
DPPH•	radical α - α -difetil- β -picrilhidrazila
DL_{50}	dose letal para 50% da população em estudo
EtOH	etanol
EtOAc	acetato de etila
FeCl_2	cloreto férrico
g	grama
GDH	glutamato desidrogenase
GK	glucoquinase
GLC	cromatografia líquido-gás
HA	hidroalcoólico (a)

HCl	ácido clorídrico
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hex	hexano
HOCl	ácido hipocloroso
K ⁺	íon potássio
K ₂ Cr	dicromato de potássio
KCN	cianeto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
M	mol/L
mM	mol.L ⁻¹
MeOH	metanol
Mo	molibdênio
Mg	magnésio
mg.dL ⁻¹	miligrama por decilitro
mg.kg ⁻¹	miligrama por quilo
mL	mililitro
mm	milímetro
Na ⁺	íon sódio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
NaNO ₂	nitrito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	sulfato ferroso amoniacal
Nm	nanômetro
NO [·]	radical óxido nítrico
·O ₂ ⁻	íon superóxido
¹ O ₂	oxigênio singleto
·OH	radical hidroxila
PC	piruvato carboxilase
PDH	piruvato desidrogenase
Pyr	piruvato
ROO [·]	radical peroxila
RO [·]	radical alcóxila
RONs	espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
STZ	estrepzotocina
TCA	ciclo do ácido cítrico
TEA	tri-etanolamina
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UI	unidades internacionais
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta-visível
Zn	zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 FAMÍLIA CUCURBITACEAE	18
3.2 GÊNERO <i>Cucumis</i>	20
3.3 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Cucumis anguria</i> L.	21
3.4 ESPÉCIE <i>Cucumis anguria</i> L.	21
3.5 O <i>DIABETES</i> E O ESTRESSE OXIDATIVO	24
3.6 FLAVONÓIDES	26
3.7 COMPOSTOS FENÓLICOS	27
3.8 POLISSACARÍDEOS	28
3.9 AMINOÁCIDOS	30
3.9.1 L-Alanina	32
3.9.2 L-Arginina	32
3.9.3 L-Leucina	33
3.10 ELEMENTOS-TRAÇO	34
3.10.1 Cromo	34
3.10.2 Magnésio	36
3.10.3 Selênio	37
3.10.4 Vanádio	37
3.10.5 Zinco	38
3.11 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	40
3.11.1 Atividade antioxidante	40
3.11.2 Atividade citotóxica	41
3.11.3 Atividade farmacológica	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	42
4.2 SOLVENTES E REAGENTES	42
4.3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES	42
4.3.1 Preparo da amostra	43
4.3.2 Determinação qualitativa de metabólitos secundários em análise fitoquímica das frações HEX, DCM e AE do extrato hidroalcoólico	43
4.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS	44
4.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	45
4.6 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	46
4.6.1 Extração clorofórmio-metanol	47
4.6.2 Extração aquosa a frio	47
4.6.3 Extração aquosa a quente	48
4.6.4 Extração alcalina a quente	48
4.7 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	50
4.7.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo	50
4.7.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling	51
4.8 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	53
4.8.1 Preparo da amostra	53

4.8.2 Derivatização da amostra.....	54
4.8.3 Determinação de aminoácidos por CLAE.....	55
4.9 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO.....	56
4.9.1 Preparo da amostra.....	56
4.9.2 Determinação de elementos-traço	56
4.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	57
4.10.1 Atividade antioxidante	57
4.10.1.1 Avaliação da capacidade antioxidante através da formação de um complexo de fosfomolibdênio	58
4.10.1.2 Método de reatividade contra o radical livre estável DPPH•.....	59
4.10.1.2.1 Determinação do IC ₅₀ do padrão – ácido ascórbico (AA) e rutina	60
4.10.2 Atividade citotóxica.....	60
4.10.2.1 Preparo da amostra.....	60
4.10.2.2 Cultivo celular.....	61
4.10.2.3 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	61
4.10.3 Atividade farmacológica	62
4.10.3.1 Condições experimentais	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES	63
5.2 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS	66
5.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	68
5.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	69
5.5 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	72
5.6 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO	74
5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	74
5.7.1 Atividade antioxidante	74
5.7.1.1 Avaliação da capacidade antioxidante total através da formação do complexo fosfomolibdênio	75
5.7.1.2 Método de reatividade das amostras de maxixe com o radical livre DPPH•	75
5.7.1.2.1 Cinética da reação de consumo do DPPH•	76
5.7.1.2.2 Atividade antioxidante relativa (AAR%) ao consumo de DPPH• pelo extrato de maxixe	77
5.7.2 Atividade citotóxica.....	79
5.7.3 Atividade farmacológica	80
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

As mudanças que vem acontecendo no ambiente e no comportamento humano, incluindo o seu estilo de vida sedentário, desde o último século, resultaram em índices crescentes de *Diabetes* (ZIMMET, ALBERTI e SHAW, 2001).

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica crônica, que representa um problema de saúde pública permanente, que afeta o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (RAHIMI et al., 2005). Representa um grupo heterogêneo de quadros hiperglicêmicos característicos, com comprometimento absoluto ou relativo da utilização da glucose e da secreção e/ou ação da insulina (REAVEN, 1988).

O impacto que o *Diabetes* acarreta na qualidade de vida, a possibilidade de severas complicações e a necessidade do auto-cuidado são fatores que tem motivado os pacientes portadores dessa patologia a buscarem e utilizarem terapias complementares (SHAPIRO e GONG, 2002). Pacientes que tem utilizado recursos naturais como fonte de substâncias bioativas para seu tratamento representam um número representativo, estimado em 60% da população mundial (BROWN, 1998).

Na Índia, plantas medicinais são usadas como tratamento complementar para *Diabetes* e foram indicadas para essa finalidade em textos da medicina Ayurvédica, escritos há mais de 2500 anos (AJGAONKAR, 1979). Um compêndio *cross-cultural* cita 1200 espécies medicinais usadas no tratamento dessa patologia (MARLES e FAMSWORTH, 1995). No entanto, nenhuma destas plantas tem demonstrado benefício comparável aos hipoglicemiantes orais sintéticos ou à insulina (SHAPIRO e GONG, 2002). A maioria dos pacientes portadores de DM tipo 2 necessariamente precisa da prescrição de hipoglicemiantes orais, somados às indispensáveis mudanças nos hábitos de vida.

O uso de produtos naturais como modelo para síntese de fármacos ou a simples utilização pela população é uma tendência crescente, sendo que muitas pesquisas avaliando esses produtos têm sido realizadas. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos usados na terapêutica atual foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas.

Frutos frescos e inteiros de *Cucumis anguria* L., popularmente conhecido por maxixe, têm sido utilizados em forma de suco (1 fruto para 1 copo com água), como

terapia complementar ao *Diabetes* e manutenção das metas glicêmicas. O presente trabalho visa contribuir para o estudo da composição fitoquímica e das atividades biológicas da espécie em questão, uma vez que as informações científicas acerca da espécie são restritas, especialmente relacionadas a atividade sobre a homeostase glicêmica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica e as atividades biológicas do extrato aquoso dos frutos inteiros de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a composição qualitativa dos metabólitos fitoquímicos presentes no extrato hidroalcoólico de *C. anguria*;
- Extrair, purificar e identificar os polissacarídeos na espécie;
- Extrair, identificar e quantificar os aminoácidos presentes no táxon;
- Investigar a presença e quantificar os elementos-traço presentes em *C. anguria*;
- Investigar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso da espécie na concentração utilizada pela população;
- Determinar as concentrações de flavonóides totais e fenólicos totais presentes nas amostras de *C. anguria*;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato aquoso da planta, por meio da formação de um complexo fosfomolibdênio e da reatividade contra o radical livre estável α - α -difenil- β -picrilhidrazila(DPPH•);
- Determinar a atividade biológica do extrato aquoso de *C. anguria* em cobaias diabético-induzidas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA CUCURBITACEAE

A família Cucurbitaceae foi descrita por Antonie Laurent de Jussieu e inclui aproximadamente 119 gêneros, com 775 espécies distribuídas especialmente em regiões tropicais e poucas em climas temperados (MEBBERLEY, 1997). Está inserida na ordem Violales, a qual inclui 23 famílias botânicas, com muitas espécies comestíveis e ornamentais, de expressivo valor econômico e medicinal.

No Brasil, a família é representada por 30 gêneros, com aproximadamente 200 espécies relatadas (Barrozo, 1978 #33). Destes 30 gêneros, destacam-se *Cucurbita* L. e *Cucumis* L., ambos polimórficos e amplamente cultivados.

Além disso, inúmeros gêneros da família Cucurbitaceae possuem importância farmacológica, como *Cucumis* L. e *Momordica* L. – ambos comestíveis e de importante valor econômico no Brasil - por representarem cerca de 23% do volume de hortaliças comercializadas no país (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

As plantas do gênero *Cucumis* são caracterizadas pela biossíntese, a partir do ácido mevalônico, de um grupo de mais de 20 triterpenóides tetracíclicos oxigenados, denominados cucurbitacinas (cucs) (METCALF e METCALF, 1992).

As cucurbitacinas (FIGURA 1) conferem um sabor amargo ao paladar, e a elas se atribui a potente atividade biodinâmica e tóxica para as espécies em que são encontradas (PAGOTTO, KAPLAN e GOTTLIEB, 1995). São substâncias aleloquímicas que exercem função protetora ao vegetal (repelente, formicida e tóxica) contra fitófagos e fungos parasitas (BRAGA, KREIS e OLIVEIRA, 1996).

As cucs estão comumente associadas a espécies da família Cucurbitaceae, mas têm sido identificadas também, em espécies das famílias Cruciferae, Begoniaceae, Scrophulariaceae, Primulaceae, Datisceae, Desfontainaceae, Elaeocarpaceae, Sterculiaceae, Polemoniaceae, Rubiaceae, e Rosaceae (DINAN, HARMATHA e LAFONT, 2001; SHIBUYA, SHINYA e EBIZUKA, 2004). Além disso, estão presentes em algumas taxa da família Cucurbitaceae, usados na medicina popular brasileira, tais como a “buchinha” (*Luffa operculata* L.), “taiuiá” (*Wilbrandia*

ebracteata Cogn. e/ou *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.) e “nhandiroba” (*Fevillea trilobata* L.).

Nesses vegetais, as cucs são encontradas em maior concentração nos frutos, mas também nas demais partes vegetativas, como raízes, caules, folhas e sementes (ARRUDA-GATTI e VENTURA, 2003).

A história do isolamento e determinação estrutural das cucurbitacinas se confunde com a própria história da fitoquímica. A primeira substância isolada, a elaterina, mais tarde denominada cuc E, data de 1831 (VALENTE, 2004).

As primeiras agliconas isoladas com esqueleto cucurbitano foram nomeadas pela palavra cucurbitacina, seguida de uma letra, de acordo com a cronologia do isolamento/elucidação estrutural. No entanto, isso não constitui uma regra geral, visto que atualmente, são observados diversos nomes para essas substâncias (VALENTE, 2004). Cerca de 50 análogos de cucs já foram identificados, mas as cucs B e D são as mais freqüentes na natureza (DINAN, HARMATHA e LAFONT, 2001). Em 91% das espécies da família das Cucurbitaceas identificadas, a cuc B é a forma mais comum, seguida por cuc D (69%), cucs G e H (47%), cuc E (42%), cuc I (22%), cuc J (9%) e cuc A (7%) (METCALF e METCALF, 1992).

Geralmente, as cucs estão presentes nas plantas como β -glucosídeos, contendo 30 carbonos. Podem também ser obtidas na forma livre, especialmente nas sementes (DINAN, HARMATHA e LAFONT, 2001). Possuem um esqueleto 19(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanost-5-eno (cucurbitano), incluindo um grupo *gem*-dimetil em C-4 e metilas em C-9 e C-14. Estruturalmente são classificadas de acordo com suas funcionalidades no anel A, modificações na cadeia lateral e considerações estereoquímicas (VALENTE, 2004). Todas as cucs também possuem uma dupla ligação entre C-5 e C-6.

A estrutura molecular dessas substâncias possui uma similaridade significativa com triterpenos esteroideogênicos. No entanto, a presença de um grupamento metila em C-9 e, eventualmente, em C-10 exclui essas moléculas da classificação como triterpenos esteroidais. O padrão de oxigenação inclui um grupamento hidroxila ou carbonila no C-3, além da possibilidade de oxigenação em C-2, C-7, C-11, C-16, C-20, C-22 e C-25 (VALENTE, 2004).

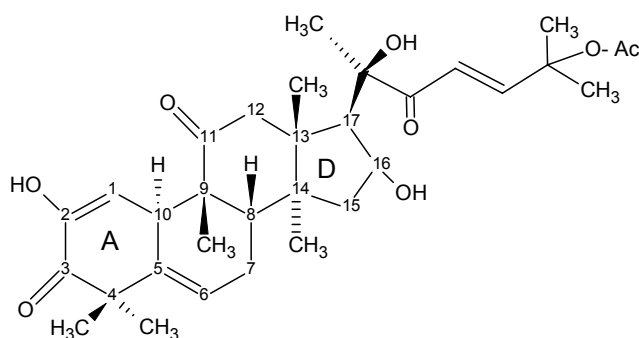


FIGURA 1 - ESQUELETO CUCURBITANO

FONTE: GREIGE-BERGES et al (2007)

Apesar de as cucs estarem presentes como 2 β -O-glicosídeos, quase sempre são hidrolisadas no processo de extração formando geninas, especialmente na presença de atividade elastase (DINAN, HARMATHA e LAFONT, 2001).

As cucs primárias B e E são formadas por processos enzimáticos durante o desenvolvimento e maturação das plantas. Cuc B pode ser metabolizada em cucs A, C, D, F, G e H, sendo isso característico de *Cucumis* (METCALF e METCALF, 1992).

O grande interesse que essas substâncias têm despertado está relacionado principalmente a sua toxicidade, ao seu amplo espectro de atividades biológicas e aos efeitos terapêuticos. Têm sido utilizadas, há séculos, por suas propriedades purgativas. Além dessa atividade, possuem elevada atividade citotóxica e antitumoral. Recentemente, as cucs foram empregadas como marcador biogenético, na quimiossistemática da super ordem Violiflorae (VALENTE, 2004).

3.2 GÊNERO *Cucumis* L.

O nome do gênero *Cucumis* descrito por Carl Linnaeus deriva de *cuce*, palavra céltica que significa “oco” (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Inclui 35 espécies tropicais, muitas das quais são úteis como recursos medicinais e na produção de compostos flavorizantes para uso em cosméticos e alimentos (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Os taxa do gênero *Cucumis* provêm de duas áreas geográficas distintas: uma, ao leste da África, Península Arábica e leste do Mediterrâneo, sendo denominadas de grupo africano; e a outra, provêm da Índia, ao sul e à leste do Himalaia, que abrange os exemplares do grupo asiático. Segundo Leppik (1966), o centro primário da origem do gênero *Cucumis* situa-se na área de maior concentração das espécies do grupo africano, a partir do qual as plantas selvagens foram disseminadas em muitas direções, regiões onde foram domesticadas.

As espécies selvagens caracterizam-se pela ampla diversidade de tamanho, cor e espiculosidade, bem como pela produção de frutos amargos devido à presença de cucs, que constitui um mecanismo de sobrevivência nas savanas africanas contra animais herbívoros (PARTENIANI, 1988).

Vários representantes do gênero *Cucumis* apresentam atividade antimicrobiana, antiinflamatória (SALAMA et al., 1986; SALAMA, DUQUE e DÍAZ, 1995), antitumoral (UR-RAHMAN et al., 1973) e anti-helmíntica (ZINCHENKO, MINDLIN e PROKOPOVICH, 1956). Estudos químicos demonstraram a presença de esteróis, triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos, flavonóides, aminoácidos e proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos vitaminas e minerais em *Cucumis* spp. (SALAMA et al., 1986).

3.3 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Cucumis anguria* L.

A espécie *Cucumis anguria* L. pode ser definida taxonomicamente como uma espécie pertencente ao reino Plantae; divisão Magnoliophyta; ordem Violales; família Cucurbitaceae e gênero *Cucumis* L.

3.4 ESPÉCIE *Cucumis anguria* L.

O maxixe (FIGURAS 2 e 3) foi, inicialmente, considerado nativo das Américas, mas teve sua origem na África, sendo considerado um mutante não amargo da espécie selvagem africana *Cucumis longipes* Hook.

No Brasil, foi introduzido há cerca de 300 anos, em virtude do tráfico de escravos (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997). Sendo assim, a maior área de produção de maxixe situa-se nas regiões brasileiras de forte influência da cultura africana, como o norte, o nordeste e o sudeste do país. Nessas regiões, essa hortaliça participa da culinária tradicional, sendo consumida na forma de “maxixada”, preparada a partir do fruto maduro, cozido com outros ingredientes (YOKOYAMA e SILVA JÚNIOR, 1988). O maxixe é muito utilizado como alimento no oeste da Índia (BAIRD e THIERET, 1988) e no Caribe (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997). É uma espécie de clima quente, adaptada à pluviosidade e às temperaturas elevadas. No Brasil, é cultivada nos estados do Rio de Janeiro, Bahia e Minas Gerais. Além disso, é produzido nas Guianas, na Colômbia, na América Central, nas Antilhas e ainda nos Estados Unidos (CORRÊA, 1974).

A espécie é chamada, na região amazônica, de maxixe ou pepino-de-índio. Em outras regiões do país, é conhecida como maxixe-bravo, maxixe-do-norte, maxixeiro, maxixe-do-mato, maxixo, pepino-castanha, pepino-de-burro, pepino-espinhoso, cornichão, cornichão das Antilhas. É conhecido ainda, como pepino-silvestre na Venezuela; *cucumber* e *west-india gherkins* nos países de língua inglesa; *gurke* e *whest-indische* na Alemanha e *concombre-des-Antilles* na França. (CORRÊA, 1974; STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Dados da medicina tradicional apontam que o fruto, além de comestível, é usado na forma de suco como sudorífero (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

A planta é monóica, anual, com caule rasteiro, ramificado, anguloso e áspero, de hábitos de crescimento indeterminado e prostrado (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Apresentam folhas cordiformes, sublobadas e de base emarginada, profundamente 5-lobadas, de 8-10 cm de comprimento, com pecíolo delicado, anguloso e híspido. Suas flores são brancas, de corola partida e segmentos mucronados (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Flores masculinas fasciculadas, com pedicelo curto e filiforme; cálices campanulados, hirsutos e com 5-7 mm de comprimento; corola de 1 cm de comprimento; estames com filetes glabros, com 1-2 mm de comprimento; anteras com 2 mm de comprimento e conectivo apendiculado. Flores femininas com pedicelo cilíndrico, robusto, hirsuto, com 5-10 cm de comprimento; estaminódio liguliforme, com 1-2 mm de comprimento; ovário oblongo, muricado; estilete com 1-2 mm de comprimento, com estigmas coniventes (CORRÊA, 1974).

Os frutos apresentam grande variedade quanto ao formato, presença e ausência de espículos e sabor amargo (LOWER, EDWARDS e BASSET, 1986). São ovóides, aculeados, concolores ou com faixa branca longitudinal; na maturidade amarelo claro; sementes albas, pequenas e marginadas (CORRÊA, 1984; STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). A baga é indeiscente e com mesocarpo branco (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).



FIGURA 2 - ASPECTO VEGETATIVO DE *Cucumis anguria* L.



FIGURA 3 - FRUTO INTEIRO, EM CORTE TRANSVERSAL E LONGITUDINAL DE *Cucumis anguria* L.

3.5 O *DIABETES* E O ESTRESSE OXIDATIVO

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro, sendo essencial à vida aeróbica e ao metabolismo humano, uma vez que o oxigênio é o último aceptor no fluxo de elétrons, que produz energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) (PIETTA, 2000).

No entanto, problemas ocorrem quando o fluxo de elétrons é incompleto, gerando espécies químicas altamente reativas, denominadas radicais livres. Exemplos de radicais livres, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), incluem o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$), o radical alcoxila ($\text{RO}\cdot$) e o radical óxido nítrico (NO). Além de ROS de natureza radicalar, existem ROS não-radicalares, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (PIETTA, 2000).

É amplamente aceito que algumas ROS têm efeito positivo sobre o organismo, por estarem envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intracelular, além de síntese de importantes compostos biologicamente ativos (HALLIWELL, 1997).

No entanto, as ROS podem ser extremamente danosas ao organismo. São responsáveis por alterações celulares (danos ao DNA, à proteínas, incluindo a oxidação de importantes enzimas) e pelo início da peroxidação de lipídios poliinsaturados da membrana celular (COMPORI, 1985; HALLIWELL, 1997). A fim de evitar esses danos, o metabolismo humano dispõe de sistemas de proteção contra radicais livres.

Estes sistemas incluem antioxidantes endógenos e exógenos. Os primeiros representam sistemas de defesa enzimática, como glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, que metabolizam superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, prevenindo a formação de compostos deletérios (PIETTA, 2000; ATTARD, BRINCAT e CUSCHIERI). Há, também, sistemas de defesa não-enzimáticos, como glutathione, peptídeos de histidina, proteínas ferro-ligadas (ferritina e transferrina), ácido dihidrolipóico, CoQ10 reduzida, melatonina, e outros.

Todos estes sistemas de defesa são complementares uns aos outros, uma vez que atuam contra diferentes espécies, em diversos compartimentos celulares (PIETTA, 2000). Em geral, suprimem a formação de radicais livres e o processo de

reações em cadeia ou inativam radicais livres, evitando a propagação de reações em cadeia.

É sabido que o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a geração de radicais derivados do oxigênio – os radicais livres – e o potencial antioxidante do organismo (ABDOLLAHI et al., 2004). O estresse oxidativo tem sido apontado como uma via comum relacionada a diversos mecanismos de patogênese de doenças cardiovasculares, nefropatia, neuropatia, retinopatia e disfunção erétil, *diabetes* e suas complicações (SHIH, WU e LIN, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que o *Diabetes* está associado a um aumento na formação de radicais livres e a diminuição no potencial antioxidante. O aumento no estresse oxidativo pode ocorrer devido a múltiplos fatores, sendo que o principal deles é a auto-oxidação da glucose. No entanto, também contribuem para esse processo o desequilíbrio na oxidação/redução celular, a redução das substâncias antioxidantes e das enzimas que metabolizam os radicais livres formados, a elevação de elementos pró-oxidativos, como a ferritina e a homocisteína, a glicação de proteínas e a ligação de produtos finais da glicação (AGEs) aos seus receptores (RAGE). A glicação protéica culmina com a alteração da própria proteína e das funções celulares. A ligação de AGEs a RAGEs pode provocar modificações nas sinalizações celulares, que favorecem a produção de radicais livres (PENEKOFER, SCHWERTZ e FLOREZAK, 2002).

Devido a uma parcial eficiência dos sistemas de defesa endógenos e à existência de diversas situações fisiopatológicas (tabagismo, exposição a poluentes e à radiação ultravioleta, dieta rica em lipídeos saturados etc.), em que as ROS são produzidas excessivamente, antioxidantes provindos da dieta são necessários para reduzir os efeitos cumulativos dos danos oxidativos. Por isso, tem sido expressivo o interesse na busca por substâncias antioxidantes naturais, especialmente a partir de alimentos. As plantas contêm uma ampla variedade dessas substâncias, que inclui o ácido cinâmico, as cumarinas, os diterpenos, os flavonóides, as lignanas, os monoterpenos, os fenilpropanóides, os fenóis, os ácidos fenólicos, os taninos e os triterpenos. Recebem especial atenção, devido a sua conhecida função quimiopreventiva contra danos oxidativos, as vitaminas e os compostos fenólicos (WU e NG, 2008), cujas evidências se somam a cada dia, aumentando sua importância como antioxidante (PIETTA, 2000).

3.6 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, e também a partir do malonato. Sua estrutura básica é constituída pelo núcleo flavan, que consiste em 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), denominados A, B e C (FIGURA 4) (PIETTA, 2000).

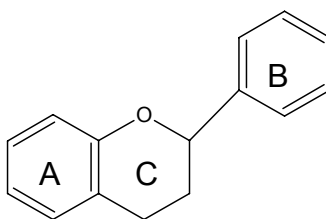


FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES

FONTE: PIETTA (2000)

As várias classes de flavonóides diferem na extensão de oxidação e no padrão de substituição no anel C, enquanto que compostos de um mesmo grupo diferem entre si, segundo o padrão de substituição nos anéis A e B. Recentemente, foi provado que os flavonóides provindos da dieta podem ser absorvidos em concentrações capazes de desencadear efeito antioxidante. De acordo com a maioria dos autores, os flavonóides na forma glicosídica são hidrolisados as suas respectivas agliconas no trato gastrointestinal. No entanto, a forma glicosídica também é absorvida, sendo que a porcentagem de absorção, normalmente, é baixa em relação a dose ingerida (HOLLMAN e KATAN, 1997).

A composição do alimento pode representar um fator importante para afetar a biodisponibilidade dos flavonóides. Proteínas, por exemplo, podem ligar-se aos polifenóis, reduzindo a sua biodisponibilidade (ICHIKAWA et al., 1992); enquanto que outros flavonóides têm sua absorção favorecida quando em presença de lipídeos (PIETTA et al., 1998).

Durante a absorção através da membrana intestinal, os flavonóides são transformados em seus glucuronóides e sulfatos (KING e BURSILL, 1998). A pequena porção absorvida é, então, metabolizada por enzimas hepáticas, tornando

esses conjugados mais polares e mais facilmente excretáveis pela urina, ou complexados para retornarem ao duodeno através da vesícula biliar. No entanto, a maior parte dos flavonóides ingeridos não é absorvida, sendo degradada pela microbiota intestinal (PIETTA, 2000).

Muitos ácidos fenólicos são produzidos e, podem ser absorvidos e submetidos à conjugação e O-metilação no fígado, retornando à circulação. Esse aspecto é relevante para a proteção antioxidante porque, por meio dos ácidos fenólicos, pode-se estimar a quantidade de flavonóides ingeridos (30 a 60%), e também, porque alguns desses metabólitos possuem atividade comparada aos seus precursores (MERFORT et al., 1996). Os mecanismos de ação antioxidante podem incluir a supressão da formação de ROS, por inibição enzimática, ou por elementos-traço quelantes, envolvidos na produção de radicais livres e desativação de ROS.

Os flavonóides representam, portanto, antioxidantes importantes, mas desde que ingeridos 800 mg ao dia, no mínimo (PIETTA, 2000).

3.7 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos (FIGURA 5) constituem uma classe de substâncias com ampla gama de atividades biológicas e de estruturas químicas. Possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 1999).

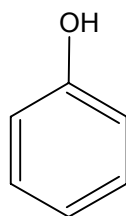


FIGURA 5 – ESTRUTURA DO ÁCIDO FÊNICO, COMPOSTOS FENÓLICOS

FONTE: MARCUCCI, WOISKY e SALATINO (1998)

Existem diversas classes de compostos fenólicos, que ocorrem de maneira universal em plantas vasculares e que podem desempenhar importantes atividades biológicas. Esse grupo de substâncias abrange as ligninas e os taninos. Além disso, estruturas fenólicas são encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenos (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 1999). A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos. Para alguns derivados de ácidos fenólicos, tem sido relatada uma atividade antioxidante. Essas evidências têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente, possuindo compostos fenólicos (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 1999).

3.8 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos constituem um dos três principais grupos de carboidratos, juntamente com os oligossacarídeos e os monossacarídeos – carboidratos mais simples, que constituem as unidades químicas fundamentais dos carboidratos mais complexos (ASPINAL, 1982; COLLINS e FERRIER, 1996). São polímeros de condensação, de elevada massa molar e que contêm dez ou mais unidades monossacarídicas ou seus derivados (ácidos urônicos, compostos aminados, etc.). Esses polímeros são obtidos a partir da formação de ligações glicosídicas, pela eliminação de água entre duas moléculas adjacentes. Os monossacarídeos, geralmente, possuem cinco (pentoses) e seis (hexoses) átomos de carbono, arranjados ciclicamente (forma furanosídica ou piranosídica, respectivamente) (ASPINAL, 1982).

As ligações glicosídicas ocorrem entre o carbono anomérico C-1 de um hemiacetal ou C-2 de um hemicetal e um grupo hidroxila qualquer de outro carboidrato que age comoceptor ou aglicona, apresentando uma conformação α ou β , dependendo da configuração do carbono anomérico em ligação. Podem apresentar as mais variadas composições e conformações, além da possibilidade de serem lineares ou ramificados (COLLINS e FERRIER, 1996).

As cadeias polissacarídicas compostas por um único tipo de unidade monossacarídica são chamadas homopolissacarídeos, e as que apresentam diferentes tipos, são denominadas de heteropolissacarídeos. A nomenclatura dos homopolímeros é feita de acordo com o monossacarídeo que os compõem: glucana para um homopolímero de glucose e manana para manose, por exemplo. Da mesma forma são nomeados os heteropolissacarídeos. No caso de uma cadeia principal formada de manose e ramificações de xilose, esse polissacarídeo é denominado xilomanana (ASPINAL, 1982).

Polissacarídeos isolados de produtos naturais (cogumelos, algas, líquens e vegetais superiores) têm chamado a atenção da área biomédica, devido ao amplo espectro de propriedades terapêuticas e à baixa toxicidade. Comprovadamente, são mais de 300 tipos de polissacarídeos isolados de produtos naturais (QUANHONG et al., 2005), sendo que desde 1960, atividades biológicas têm sido atribuídas a essas substâncias, como antitumoral, hipoglicemiante, imunomoduladora, anticoagulante, hipolipidêmica, entre outras (TIAN e FENG, 1995).

Podem ainda, agir como material de reserva, lubrificante de articulações, agentes de coesão, sinalização celular, substâncias de proteção e componentes estruturais (ASPINAL, 1982).

O estudo da propriedade hipoglicemiante desses compostos tem evoluído rapidamente, apesar de a maioria contemplar apenas os efeitos de drogas vegetais, mas não o mecanismo pelo qual atuam.

Há algum tempo, é estabelecido que dietas ricas em polissacarídeos reduzem tanto os níveis de colesterol plasmático, quanto os de glucose. Esses fatos foram comprovados para polissacarídeos formadores de gel, não digeríveis, como as pectinas, a goma tragacanta, a goma guar e outras (LEEDS, 1982). Os melhores efeitos em humanos têm sido obtidos com diferentes galactomananas (LEEDS, 1982). No entanto, para alcançar a redução dos níveis não-fisiológicos de glicemia, doses relativamente altas de polissacarídeos hidrocoloidais têm sido administradas. Porém, altas doses podem desencadear efeitos adversos, como meteorismo decorrente da degradação microbiana das galactomananas (FRANZ, 1989). Os efeitos hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicos são atribuídos à formação de uma barreira intestinal de reabsorção e, em parte, a inativação da amilase (FRANZ, 1989). Glucanas extracelulares de bactérias têm efeito similar as galactomananas. Um polissacarídeo de alta viscosidade de *Acetobacter* sp. apresenta a propriedade

de reduzir o aumento da glicemia pós-prandial. Esse efeito tem relação direta com a viscosidade da solução desse polissacarídeo (FRANZ, 1989).

Experimentos que avaliaram a atividade hipoglicemiante direta de polissacarídeos hidrocoloidais mostram a menor importância do efeito formador de filme, sendo que a redução de mais de 50% na glicemia foi dose-dependente. O estudo revelou ainda uma relação estrutura-atividade essencial para o efeito mediado por uma composição polissacarídica formada de ácido galacturônico, ácido glucurônico e ramnose (TOMODA et al., 1987).

Diferentes tipos de abóboras (Cucurbitaceae) foram analisados, e foi demonstrado que o efeito hipoglicemiante dos carboidratos de alta massa molar não foi proeminente, enquanto que os de baixa massa molar apresentaram um resultado oposto (ZHANG e YAO, 2002). Além disso, a glicemia de 70 a 80% de pacientes portadores de DM tipo 2 foi reduzida após o consumo de 30 g de abóbora em pó (CHEN et al., 1994). Estudos em ratos com *Diabetes* induzida por haloxano indicaram que os polissacarídeos da abóbora são compostos efetivos e com significativa ação hipoglicemiante (XIONG e CAO, 2001). Acredita-se que esses polissacarídeos atuam aumentando os níveis séricos de insulina, pela estimulação das células β -pancreáticas, além de prevenirem a sua destruição por compostos antioxidantes (QUANHONG et al., 2005).

Considerando o exposto, poucos estudos têm sido realizados com polissacarídeos da família Cucurbitaceae, sendo que a literatura apresenta dados muito restritos sobre os polissacarídeos extraídos de plantas do gênero *Cucumis* ou da espécie *Cucumis anguria* L.

3.9 AMINOÁCIDOS

Nos últimos anos, novos aminoácidos (aa) não protéicos têm sido isolados de representantes da família Cucurbitaceae. Um estudo de distribuição de alguns desses compostos tem indicado que eles podem dar informações complementares para uma avaliação quimiotaxonômica (HASLAM, 1996). No entanto, a literatura também não cita, de forma pormenorizada, aa identificados e quantificados da espécie *Cucumis anguria* L.

Aminoácidos são conhecidos por intensificar a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (BRATUSCH-MARRAIN, FERENCI e WALDHAUSL, 1980). Pesquisas indicaram que a utilização de altas concentrações de misturas específicas de aminoácidos pode estimular a secreção de insulina (BOLEA et al., 1997). Quatro aa são considerados particularmente importantes na estimulação da atividade elétrica dessas células, sendo determinantes para a secreção de insulina: leucina, isoleucina, alanina e arginina (NEWSHOLME et al., 2005). O mecanismo pelo qual essas substâncias atuam é bastante complexo e envolve o metabolismo mitocondrial. Em geral, parecem ser necessários para a geração apropriada de sinais regulatórios, que têm impacto sobre a secreção de insulina (NEWSHOLME et al., 2005).

Os aminoácidos contêm carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, arranjados de tal forma que o esqueleto carbônico formado pode ser usado na produção e na utilização de energia (ATP) pela conversão de glucose a glicogênio ou pela sua oxidação a CO_2 , via ciclo de Krebs. Podem também ser metabolizados a carboidratos ou lipídios, dependendo do *status* termodinâmico das células.

A degradação protéica muscular, com conseqüente liberação de aa, ocorre predominantemente durante estados hipercatabólicos, como o *Diabetes* (PASINI, AQUILANI e DIOGUARDI, 2004).

Os estados hipercatabólicos são caracterizados pelo aumento na circulação de moléculas catabólicas, como citocinas inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) e hormônios (catecolaminas, cortisol e renina). Recentemente, os prejuízos dos hormônios catabólicos, como a insulina, foram descobertos em estados hipercatabólicos. Os aminoácidos que deveriam ser utilizados no processo de gluconeogênese hepática não são, pois a resistência à insulina inibe a síntese de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (enzima chave à via gluconeogênica no fígado). Esse fato causa a redução da gluconeogênese via piruvato, originando lactato. Essa condição, por sua vez, cria um ciclo vicioso, em que a baixa produção de carboidratos pelo fígado fica prejudicada e aminoácidos são utilizados para produzir glucose, essencial para manter o metabolismo glucose-dependente de estruturas como o cérebro e eritrócitos (NEWSHOLME et al., 2005).

A utilização de aminoácidos como suplementação pode ser efetiva para amenizar as conseqüências metabólicas e morfológicas dos estados hipercatabólicos. No entanto, as quantidades e a composição amoniácida

apropriadas ainda não foram estabelecidas (PASINI, AQUILANI e DIOGUARDI, 2004).

Além disso, os aa atuam como moléculas sinalizadoras, em sinergismo com outras moléculas. A contribuição dos aa, especialmente os de cadeia ramificada, na via de sinalização pela insulina foi claramente demonstrada, apesar de alguns efeitos ainda se manterem controversos e em discussão. O efeito positivo dos aa, particularmente da leucina, sobre o transporte de glucose modulado pela insulina em adipócitos de ratos obesos foi estabelecido (HINAULT, OBBERGHEN e MOTHE-SATNEY, 2006).

3.9.1 L-Alanina

A L-alanina tem sido destacada por seu efeito insulínótropico, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MCCLLENAGHAN et al., 1996; DIXON et al., 2003). Esse efeito deve-se ao co-transporte com íons sódio, que resulta em despolarização da membrana celular e conseqüente influxo de cálcio intracelular (MCCLLENAGHAN, BARNETT e FLATT, 1998). A L-alanina é metabolizada e seus produtos finais incluem o glutamato, aspartato e lactato. Esse metabolismo mostrou-se importante para a estimulação da secreção de insulina (BRENNAN et al., 2002). Estas informações demonstram que de fato a combinação de co-transporte com o Na⁺ e geração de ATP resulta na ação insulínótropica da L-alanina.

3.9.2 L-Arginina

A estimulação da liberação de insulina mediada pela L-arginina tem sido relatada como conseqüência da elevação do cálcio intracelular, como resultado do transporte eletrogênico para o interior das células β via transportador mCAT2A de aa (SENER et al., 2000).

Ensaios clínicos têm revelado efeitos benéficos limitados a partir da utilização de L-arginina na terapêutica. Isso se deve, provavelmente, a sua rápida absorção e

metabolização em ornitina e citrulina, que são exportadas aos rins ou ao fígado e convertidas em prolina (BROSNAN, 2003).

3.9.3 L-Leucina

A secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, mediada por L-leucina, ocorre por um mecanismo que envolve o aumento do metabolismo mitocondrial, por ativação da enzima glutamato desidrogenase (GDH) e aumento na produção de ATP, por transaminação da leucina a cetoisocaproato que, por sua vez, entra no ciclo de Krebs via acetil-CoA (PANTEN et al., 1972). A FIGURA 6 sumariza o efeito dos aa e da glucose nas células β -pancreáticas, para a regulação da secreção de insulina.

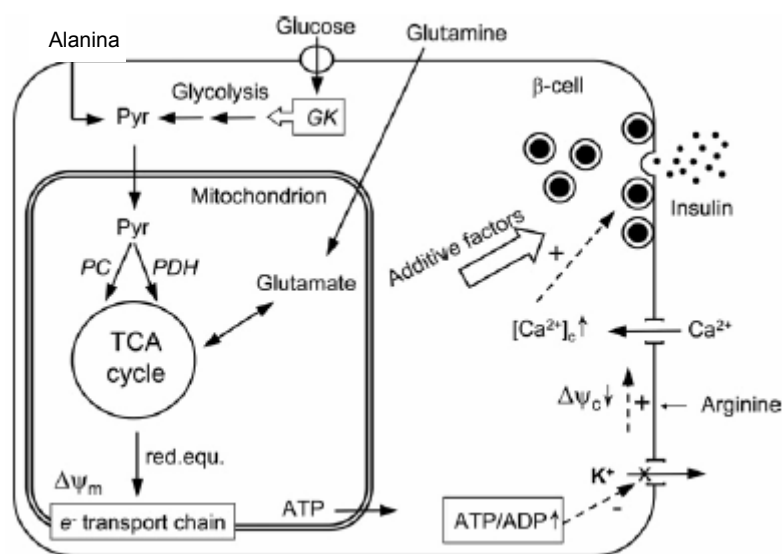


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS β -ESTIMULADAS POR GLUCOSE E AMINOÁCIDOS

FONTE: NEWSHOLME et al. (2005)

NOTA: A glucose absorvida é fosforilada pela glucoquinase (GK), produzindo piruvato (Pyr) pela via glicolítica. O Pyr entra na mitocôndria, sendo substrato para duas enzimas: piruvato desidrogenase (PDH) e piruvato carboxilase (PC). O metabolismo mitocondrial também é ativado por aa como alanina, glutamina ou glutamato. O ciclo do ácido cítrico (TCA) produz equivalentes reduzidos (red. equ.), que são transferidos à cadeia transportadora de elétrons, levando à hiperpolarização da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e à geração de ATP. O fechamento dos canais de K^+ despolariza a membrana celular ($\Delta\Psi_c$) e a abertura do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente aumenta o Ca^{2+} citosólico, gatilho à exocitose de insulina.

3.10 ELEMENTOS-TRAÇO

Elementos-traço, também conhecidos como micronutrientes, são as vitaminas e os minerais requeridos pelo organismo humano em quantidades reduzidas para funções específicas. Mais comumente, atuam como cofatores essenciais, nas reações metabólicas necessárias à produção de energia e à manutenção da vida (O'CONNEL, 2001).

Deficiências desses micronutrientes podem desencadear sérios estados patológicos. Esses elementos-traço têm sido investigados como potenciais agentes preventivos e terapêuticos, tanto para DM tipo 1, quanto tipo 2 e suas complicações (MOORADIAN et al., 1994; FRANZ e BANTLE, 1999).

Uma série de estudos tem estabelecido a associação entre DM e alterações no metabolismo de vários minerais, como zinco, cromo, magnésio, selênio e vanádio (WALTER et al., 1991; BAKER e CAMPBELL, 1992). Esses minerais são excretados pela urina em taxas mais elevadas do que o normal nos pacientes com DM, freqüentemente levando à excessiva perda mineral. Considerando que essa perda traduz a baixa disponibilidade de um mineral necessário para otimizar a secreção e/ou ação da insulina, passa a ser de imediata importância a suplementação destes compostos (WALTER et al., 1991).

3.10.1 Cromo

O cromo foi indicado como um elemento mineral essencial no final dos anos 50, após estudos em pacientes que receberam nutrição parenteral total e terem demonstrado manifestaram uma grave deficiência de cromo nesses indivíduos, resultando na tolerância à glucose, com subsequente hiperglicemia e glicosúria. Outros sinais da deficiência de cromo incluem a hiperinsulinemia, a diminuição do número de receptores de insulina, a diminuição da ligação da insulina e neuropatias DM-associadas, além de patologias vasculares (BAKER e CAMPBELL, 1992).

Apenas 1% a 2% do cromo ingerido pela dieta é absorvido no intestino delgado. Assim como muitos outros minerais, o cromo interage com vários

componentes alimentares, que promovem ou retardam a sua absorção. A quelação com aminoácidos provenientes da dieta, especialmente a *L*-histidina, ou a complexação com oxalato, abundante em muitos legumes e grãos, ou com o ácido nicotínico ou o ácido ascórbico, pode aumentar significativamente a absorção intestinal desse mineral (MERTZ, ROGINSKI e REBA, 1965; HOPKINS, RANSOME-KUTI JR e MAJAM, 1968). Uma vez absorvido no intestino, o cromo é transportado e armazenado ligado a transferrina e albumina. Sua excreção é, em grande parte, renal (NEWSHOLME et al., 2005).

A capacidade da insulina de regular o metabolismo lipídico e glicêmico depende da sua ligação a receptores específicos encontrados em muitos tecidos periféricos, como, adipócitos, músculos e fígado. Além de aumentar o número de receptores de insulina presentes em um tecido alvo, o cromo, é capaz de aumentar a ligação da insulina aos seus receptores (ANDERSON, 1998). Essa última ação pode envolver a capacidade do cromo em regular reações-chave, envolvendo a fosforilação e a defosforilação, que ativa ou inibe a ação da insulina. A insulina ativa seu receptor por meio da ligação extracelular à subunidade α , que leva à fosforilação da subunidade β ligada à membrana. O cromo, através da enzima tirosina quinase, presente no receptor de insulina, catalisa a fosforilação em presença desse hormônio. Além disso, inibe a enzima tirosina fosfatase, responsável por encerrar a resposta do receptor de insulina. Assim, tanto a crescente ativação quanto a inibição do encerramento das respostas, mediadas pelos receptores de insulina, podem influenciar significativamente a utilização de glucose pelos tecidos periféricos (NEWSHOLME et al., 2005).

A ação do cromo sobre os receptores de insulina pode estar relacionada a um complexo de cromo, denominado "fator de tolerância a glucose". Embora a identidade exata desse fator ainda não estar elucidada, o cromo é um componente essencial, além de algumas vitaminas e aminoácidos. Muitos trabalhos têm descrito que a insulina pode atuar na ausência de cromo; no entanto, a sua atividade parece aumentar na presença desse mineral.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a capacidade do cromo em melhorar a tolerância à glucose, tanto em animais quanto em humanos, especialmente naqueles com intolerância mais pronunciada (ANDERSON, 1997).

A maioria dos estudos positivos com cromo foram em pacientes com DM tipo 2, que utilizaram pelo menos 400 µg de cromo ao dia.

3.10.2 Magnésio

O magnésio constitui um cofator essencial a mais de 300 enzimas. É necessário para todos os sistemas de transportes dependentes de energia, na glicólise, no metabolismo energético-oxidativo, nas reações biossintéticas, no metabolismo ósseo, na atividade neuromuscular, no balanço de eletrólitos e na estabilização da membrana celular (DE VALK, 1999). Embora a deficiência desse mineral seja considerada rara, recentes descobertas têm sugerido que em torno de 25% dos pacientes com DM podem ter o *status* de magnésio subótimo (CAMPBELL e NADLER, 1992).

Cerca de um terço do magnésio administrado via oral é absorvido no intestino; a excreção é principalmente renal e fecal (NEWSHOLME et al., 2005).

Hormônios que auxiliam na regulação das concentrações de magnésio incluem a calcitonina, o hormônio paratireoideano e a insulina. A administração exógena de insulina ou a insulina liberada em resposta a uma carga oral glucose promovem um aumento na captação de magnésio celular, via bomba ATPase. Esse mineral, parte integrante do complexo MgATP ativado, é responsável por regular as enzimas proteína quinases, estando diretamente envolvido no controle do metabolismo da glucose, na transdução de sinal de receptores de hormônios peptídicos e na translocação de canais iônicos. A redução nas atividades enzimáticas de várias vias metabólicas foi observada em portadores de DM, como resultado da deficiência de magnésio (LAUGHLIN e THOMPSON, 1996). Os primeiros trabalhos demonstraram uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de magnésio e a glicemia em jejum, em pacientes insulinizados (MCNAIR et al., 1982). A indução de um estado hipomagnesêmico em ratos é conhecida por diminuir significativamente a sensibilidade à insulina, por meio de uma alteração no receptor de insulina tirosina-quinase associado. Embora uma quantidade reduzida de insulina tenha sido relatada em indivíduos com déficit de magnésio, a maior parte do enfoque

na suplementação de magnésio envolve a prevenção de complicações a longo prazo (SEELIG, 1989).

3.10.3 Selênio

As propriedades antioxidantes do selênio e seus potenciais benefícios à saúde têm sido alvo de muitas pesquisas e aplicações na terapêutica. Esse mineral é encontrado em diferentes concentrações no solo, de onde é incorporado em plantas e então consumido na dieta. Atua com a vitamina E, através da enzima glutathione peroxidase, sendo capaz de evitar o acúmulo de radicais livres. O controle da produção de radicais livres tem sido postulado como benéfico à prevenção da intolerância a glucose e complicações do DM. Estudos *in vitro*, utilizando adipócitos, têm revelado um efeito *insulin like* do selênio (translocação de transportadores de glucose para a membrana plasmática). Esse efeito parece ser mediado através da fosforilação de resíduos de tirosil em proteínas celulares e ribossomais, normalmente envolvidos nos efeitos do receptor da insulina (COMBS JR e COMBS, 1986).

3.10.4 Vanádio

O vanádio existe em dois grandes estados de oxidação nos fluidos biológicos, como vanadato (V) e vanadil (IV). Após a ingestão, é absorvido do duodeno e circula no plasma ligado às proteínas plasmáticas (principalmente transferrina) (POUCHERET et al., 1998). Estudos *in vitro* indicam que o vanádio pode mimetizar um certo número de ações da insulina, atuando como facilitador da captação e do metabolismo da glucose, com o aumento da sensibilidade à insulina, com a síntese de glicogênio, com a inibição da lipólise e com alterações no metabolismo protéico (NECHY, 1984; POUCHERET et al., 1998; CAM, BROWNSEY e MCNEIL, 2000). A ação do vanádio parece ser independente da insulina e pode envolver a estimulação do transporte e do metabolismo da glucose nos músculos e adipócitos. O vanádio

parece afetar diversos pontos na via de sinalização da insulina, e pode levar à *upregulation* dos receptores de insulina, com subsequente sinalização intracelular (POUCHERET et al., 1998; CAM, BROWNSEY e MCNEIL, 2000). O efeito sugerido inclui a autofosforilação do receptor de insulina, a inibição da atividade fosfo-tirosina fosfatase, o aumento da atividade da adenilato ciclase, a diminuição da atividade da enzima glucose-6-fosfatase gluconeogênica e o aumento na síntese de glicogênio (POUCHERET et al., 1998; CAM, BROWNSEY e MCNEIL, 2000). Além disso, o vanadato foi responsável por aumentar a atividade das enzimas glicolíticas glucoquinase e fosfofrutoquinase (PUGAZHENTHI e KHANDELWAL, 1990; CAM, BROWNSEY e MCNEIL, 2000).

3.10.5 Zinco

O zinco exerce um papel essencial como cofactor a mais de 200 metaloenzimas, muitas das quais regulam o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Contribui também para o armazenamento da insulina na forma inativa, que ocorre em sua presença (NEWSHOLME et al., 2005).

Cerca de um terço do zinco consumido é absorvido no duodeno, e concorre pela absorção juntamente com o cálcio, ferro não-heme e cobre. Pacientes com DM podem apresentar hipozincemia e hiperzincúria, muito provavelmente como resultado de um aumento da carga filtrada de zinco e, eventualmente, uma diminuição da absorção do mineral (KINLAW et al., 1983). A hipersecreção de insulina por pacientes obesos e portadores de DM tipo 2 também mostrou ser causa de hiperzincúria. Embora relatórios sugiram que o zinco em doses muito elevadas pode mimetizar algumas das ações da insulina, poucos estudos têm sido realizados com a suplementação de zinco no DM.

O potencial terapêutico dos elementos-traço moduladores da homeostase glicêmica, bem como as recomendações de ingestão diária estão resumidas nas TABELAS 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 - POTENCIAL TERAPÊUTICO DO CROMO, MAGNÉSIO, SELÊNIO, VANÁDIO E ZINCO

MINERAL	POTENCIAL TERAPÊUTICO
Cromo	Aumenta o número de receptores de insulina no tecido-alvo, bem como a ligação da insulina aos seus receptores; melhora a tolerância à glucose;
Magnésio	Evita, em longo prazo, as complicações do DM;
Selênio	Sua capacidade de controlar a produção de radicais livres pode ajudar a prevenir a intolerância a glucose e as complicações do DM;
Vanádio	Ação insulínica; melhora a sensibilidade à insulina;
Zinco	Cofactor essencial para metaloenzimas que regulam o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.

FONTE: NEWSHOLME (2005)

TABELA 2 – INGESTÃO DIETÉTICA DE REFERÊNCIA: MÉDIA ESTIMADA PARA GRUPOS ESPECÍFICOS

FAIXA ETÁRIA	CROMO ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)	MAGNÉSIO ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)	SELÊNIO ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)	VANÁDIO	ZINCO ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)
Crianças					
0 a 6 meses	0.2	30	15	ND	2
7 a 12 meses	5.5	75	20	ND	3
1 a 3 anos	11	80	20	ND	3
4 a 8 anos	15	130	30	ND	5
Homens					
9 a 13 anos	25	240	40	ND	8
14 a 18 anos	35	410	55	ND	11
19 a 30 anos	35	400	55	ND	11
31 a 50 anos	35	420	55	ND	11
51 a 70 anos	30	420	55	ND	11
> 70 anos	30	420	55	ND	11
Mulheres					
9 a 13 anos	21	240	40	ND	8
14 a 18 anos	24	360	55	ND	9
19 a 30 anos	25	310	55	ND	8
31 a 50 anos	25	320	55	ND	8
51 a 70 anos	20	320	55	ND	8
> 70 anos	20	320	55	ND	8
Gravidez					
14-18 anos	29	400	60	ND	12
19-30 anos	30	350	60	ND	11
31-50 anos	30	360	60	ND	11
Lactação					
14-18 anos	44	360	70	ND	13
19-30 anos	45	310	70	ND	12
31-50 anos	45	320	70	ND	12

FONTE: FOOD AND NUTRITION BOARD (1989)

NOTA: ND - não determinado

3.11 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As espécies pertencentes à família Cucurbitaceae possuem amplas atividades biológicas estudadas. Algumas espécies, inclusive, possuem atividade sobre a homeostase glicêmica comprovada. No entanto, a literatura não relata de forma conclusiva as atividades da espécie *Cucumis anguria* L., que vem sendo amplamente utilizada como terapia complementar no *Diabetes*.

3.11.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante pode ser definida como aquela intrínseca a compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos prejudiciais dos processos ou reações de oxidação, envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) (HALLIWELL, 1996).

Os primeiros trabalhos realizados por Chipault et al (1952, 1955) foram os precursores de muitos estudos da atividade antioxidante de extratos vegetais, com potencial aplicabilidade como conservante de alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

A atividade antioxidante tanto de compostos puros, quanto de extratos vegetais, tem sido determinada pela quantificação do consumo de oxigênio ou pela produção de hidroperóxidos ou outros produtos de degradação (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

Na atualidade, uma variedade de métodos está sendo utilizada para determinar a capacidade antioxidante e avaliar a degradação de radicais a partir de produtos naturais (ADELMANN, 2005).

3.11.2 Atividade citotóxica

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório em testes biológicos, há a necessidade de priorizar os ensaios preliminares *in vitro* para mensuração da toxicidade de drogas.

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, como o vermelho neutro, solúvel em água e permeável à membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

3.11.3 Atividade farmacológica

A partir das informações obtidas na comunidade sobre o uso popular de *Cucumis anguria* L. e sua potencial atividade sobre a homeostase glicêmica é que essa planta, conhecida com maxixe, foi submetida ao ensaio farmacológico preliminar, em cobaias com hiperglicemia aguda, segundo o método amplamente difundido de lesão das células β -pancreáticas por estreptozotocina (STZ).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Estão apresentados, neste capítulo, os principais materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho, bem como os procedimentos experimentais empregados.

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos de *Cucumis anguria* L. foram obtidos a partir de mudas, preparadas em estufas, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e cultivadas em uma chácara situada na região de Curitiba (Paraná), sob a orientação de um profissional da área. Foram colhidos no mês de agosto 2007, no ponto de maturação habitualmente utilizado para consumo, e foram armazenados em sacos plásticos protegidos da luz, em congelador a - 30 °C, até o processamento.

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes químicos utilizados no trabalho foram de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária.

4.3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

As análises fitoquímicas foram realizadas com o objetivo de elucidar os constituintes químicos presentes na espécie vegetal *C. anguria* L. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes das mesmas (NAKASHIMA, 1993; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 1999).

4.3.1 Preparo da amostra

Os frutos de *Cucumis anguria* L., frescos e inteiros, foram cortados em pequenos pedaços e submetidos à maceração em solução hidroalcoólica a 70% (v/v) a 50 °C, em banho-maria (BM), durante 48 h. O extrato a 20% (m/v), em relação à planta fresca, foi filtrado a quente e, uma vez resfriado, foi submetido à partição líquido-líquido, em gradiente de polaridade crescente de solventes orgânicos [hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE)].

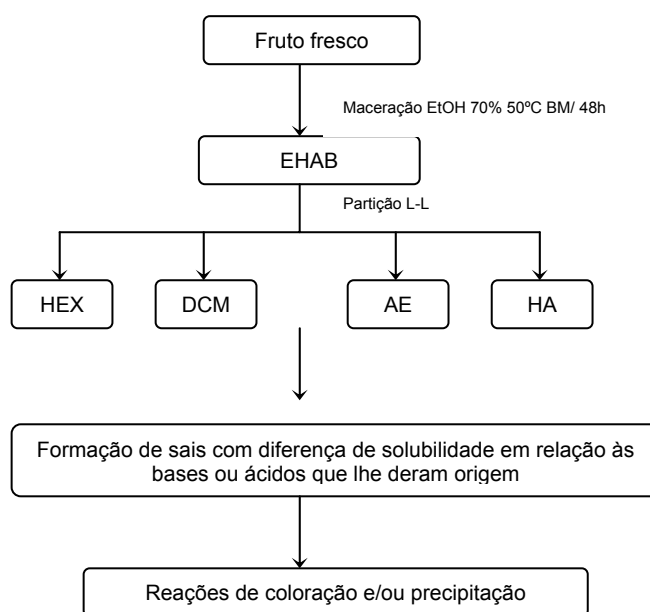


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PREPARO DA AMOSTRA PARA AS ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

4.3.2 Determinação qualitativa dos metabólitos secundários, a partir da análise fitoquímica das frações HEX, DCM, AE

A determinação qualitativa dos metabólitos presentes nos frutos inteiros de *Cucumis anguria* L. foi realizada segundo *screening* fitoquímico convencional, sendo que a identificação de cada metabólito foi feita por meio de reações específicas,

baseando-se na literatura. Foi avaliada a presença dos metabólitos: alcalóides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteróides e triterpenos, heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

4.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A concentração de flavonóides totais foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Zou, Lu e Wei (2004), citado por Wu e Ng (2008). O procedimento baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonóides em meio metanólico (FIGURA 7). A formação do complexo promove um efeito batocrômico e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. Dessa maneira, foi possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 10% (m/v) em metanol (WU e NG, 2008).

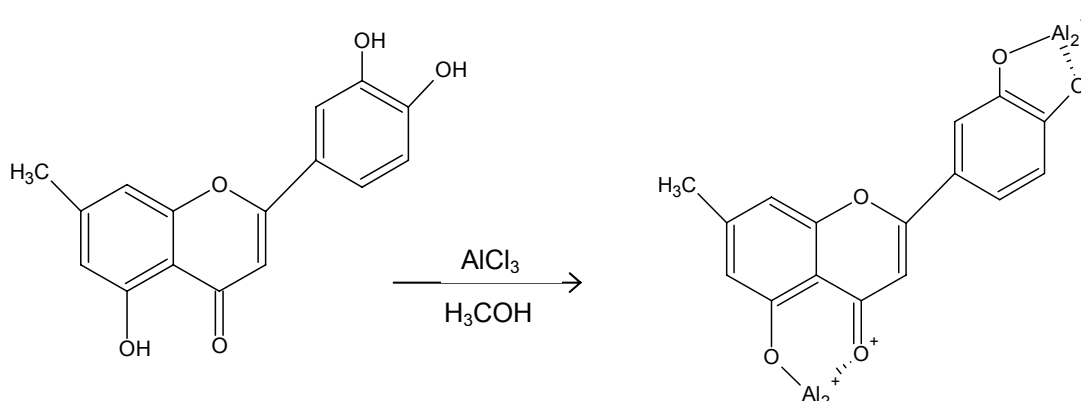


FIGURA 8 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO FLAVONÓIDE-ALUMÍNIO, EM SOLUÇÃO METANÓLICA DE CLORETO DE ALUMÍNIO

FONTE: MARCUCCI, WOISKY e SALATINO (1998)

A amostra foi preparada no momento que antecedeu a análise, partindo da planta fresca na forma que a população tem utilizado como terapia complementar para o DM, um fruto de maxixe em copo com água ao dia. Para fins de padronização, 10 diferentes frutos foram pesados e a média de suas massas (41 g) foi estabelecida para o cálculo da concentração empregada, que foi de 200 mg.mL⁻¹.

Os frutos frescos foram processados em água e os extratos aquosos foram centrifugados em centrífuga Eppendorf, modelo 5702, para rotor de 50 mL tipo Falcon®, a 4400 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado na etapa de quantificação.

Para quantificar o teor de flavonóides totais nas amostras, foi adicionado 2,5 mL da amostra a 150 µL de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) a 0,7 mol.L⁻¹. Após 6 min de repouso em temperatura ambiente, 150 µL de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 0,75 mol.L⁻¹ foi adicionada e, novamente, mantida em repouso por 6 min. Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹ e o volume foi completado com água destilada para 5 mL. A amostra foi mantida em temperatura ambiente, em repouso, por mais 15 min para que, então, a absorvância fosse determinada no comprimento de onda de 510 nm.

Para a elaboração da curva analítica foi utilizada a rutina, nas concentrações de 2,16 a 15,12 mol.L⁻¹ em metanol. Os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de rutina (mg de rutina em 100 mg de sólidos totais).

As análises foram realizadas com 10 frutos diferentes, em soluções de mesma concentração. As leituras foram realizadas no Espectrofotômetro de UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV2401 PC.

4.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de polifenóis nos extratos aquosos de maxixe foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (WU e NG, 2008). O método baseia-se na reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, em meio alcalino, aos óxidos de tungstênio e molibdênio, causada pelos compostos

fenólicos, formando um complexo de coloração azul, cuja absorção máxima ocorre em 760 nm.

Para isso, 2,5 mL do sobrenadante do resultante da centrifugação do extrato aquoso, preparado como descrito no item 4.4, foram misturados a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e a 500 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a $0,71 \text{ mol.L}^{-1}$. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 min, para a leitura espectrofotométrica.

Para a elaboração da curva analítica foi utilizado o ácido gálico, nas concentrações de 0,05 a $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ dissolvido em água destilada. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais).

As análises foram realizadas com 10 amostras de frutos, em soluções de mesma concentração. As leituras foram realizadas no Espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV2401 PC.

4.6 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os frutos de maxixe foram lavados manualmente, a fim de possibilitar a retirada de vegetais aderidos e resíduos de solo. Em seguida, foram seccionados transversalmente, estabilizados em estufa a 90°C por 10 min, e mantidos a 75°C até massa constante.

O material seco foi fragmentado em moinho de facas e transformado em pó seco. Posteriormente, foi submetido à extração e à purificação conforme a Figura 8.

As amostras foram conduzidas à deslipidificação e levadas a três processos sequenciais de extração, como descrito a seguir.

4.6.1 Extração clorofórmio-metanol

A amostra seca e pulverizada (194 g) foi deslipidificada com uma mistura clorofórmio-metanol (2:1, V/V, aproximadamente 300 mL) (MACHADO et al., 1994),

em Soxhlet, durante 72 h. O material residual foi seco e, então, submetido ao próximo processo extrativo.

4.6.2 Extração aquosa a frio

O material remanescente da extração clorofórmio-metanol foi submetido a ciclos de extração, por maceração dinâmica a frio, em temperatura de 7 °C durante 6 h, por quatro vezes consecutivas.

Após cada extração, os extratos aquosos foram centrifugados a 6000 rpm por 30 min, a fim de separar o sobrenadante do material orgânico. O material residual foi seco e conduzido ao próximo processo extrativo.

Na sequência, os polissacarídeos foram precipitados com etanol absoluto, na proporção final de 3:1. A solução alcoólica foi mantida em congelador por 12 h, a fim de auxiliar na precipitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 6000 rpm, durante 30 min. O precipitado etanólico foi solubilizado em água destilada e dialisado contra água corrente, durante 24 h, em membrana de celulose para diálise 43 mm X 27 mm (Sigma Aldrich). Após essa etapa, as misturas polissacarídicas em solução foram congeladas e liofilizadas, para a obtenção dos respectivos rendimentos.

Os sobrenadantes etanólicos, após a redução do volume, sob pressão reduzida, foram congelados, porém não foram analisadas no presente trabalho.

4.6.3 Extração aquosa a quente

O material sólido remanescente da extração anterior foi conduzido a ciclos de extração, por maceração dinâmica a quente, empregando água destilada em temperatura de 80,°C por 6 h, por sete vezes consecutivas.

Após cada extração, os extratos aquosos foram centrifugados ainda quentes a 6000 rpm, por 30 min, com o propósito de separar o sobrenadante do material orgânico. O material residual foi seco e levado ao próximo processo extrativo.

A partir do sobrenadante, os polissacarídeos foram precipitados com etanol absoluto, na proporção final de 3:1. A solução alcoólica foi deixada em congelador por 12 h, para auxiliar na precipitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 6000 rpm, durante 30 min. Da mesma forma que no item 4.6.2, o precipitado etanólico foi solubilizado em água destilada e dialisado contra água corrente, durante 24 h, em membrana de celulose para diálise 43 mm X 27 mm. Depois da etapa de diálise, as misturas de polissacarídeos em solução foram congeladas e liofilizadas, para a verificação dos respectivos rendimentos.

Os sobrenadantes etanólicos, após a redução do volume sob pressão reduzida, foram congelados, porém não foram avaliados no presente trabalho.

4.6.4 Extração alcalina a quente

O material remanescente da extração aquosa a quente foi submetido a ciclos de extração com KOH 1% (m/V) a quente, sob refluxo, em temperatura de 100 °C, por 6 h, por 3 vezes consecutivas.

Após cada extração, os extratos alcalinos foram centrifugados ainda quentes a 6000 rpm por 30 min com o objetivo de separar o sobrenadante do material orgânico.

A seguir, os polissacarídeos foram precipitados com etanol absoluto, na proporção final de 3:1. A solução alcoólica foi deixada em congelador por 12 h, a fim de auxiliar na precipitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 6000 rpm, durante 30 min. O precipitado etanólico foi solubilizado em água destilada e dialisado contra água corrente, durante 24 h, em membrana de celulose para diálise 43 mm X 27 mm. Transcorrida a diálise, as misturas de polissacarídeos em solução foram congeladas e liofilizadas, para a análise dos respectivos rendimentos.

Os sobrenadantes etanólicos, após a redução do volume, sob pressão reduzida, foram congelados, porém não foram estudados no presente trabalho.

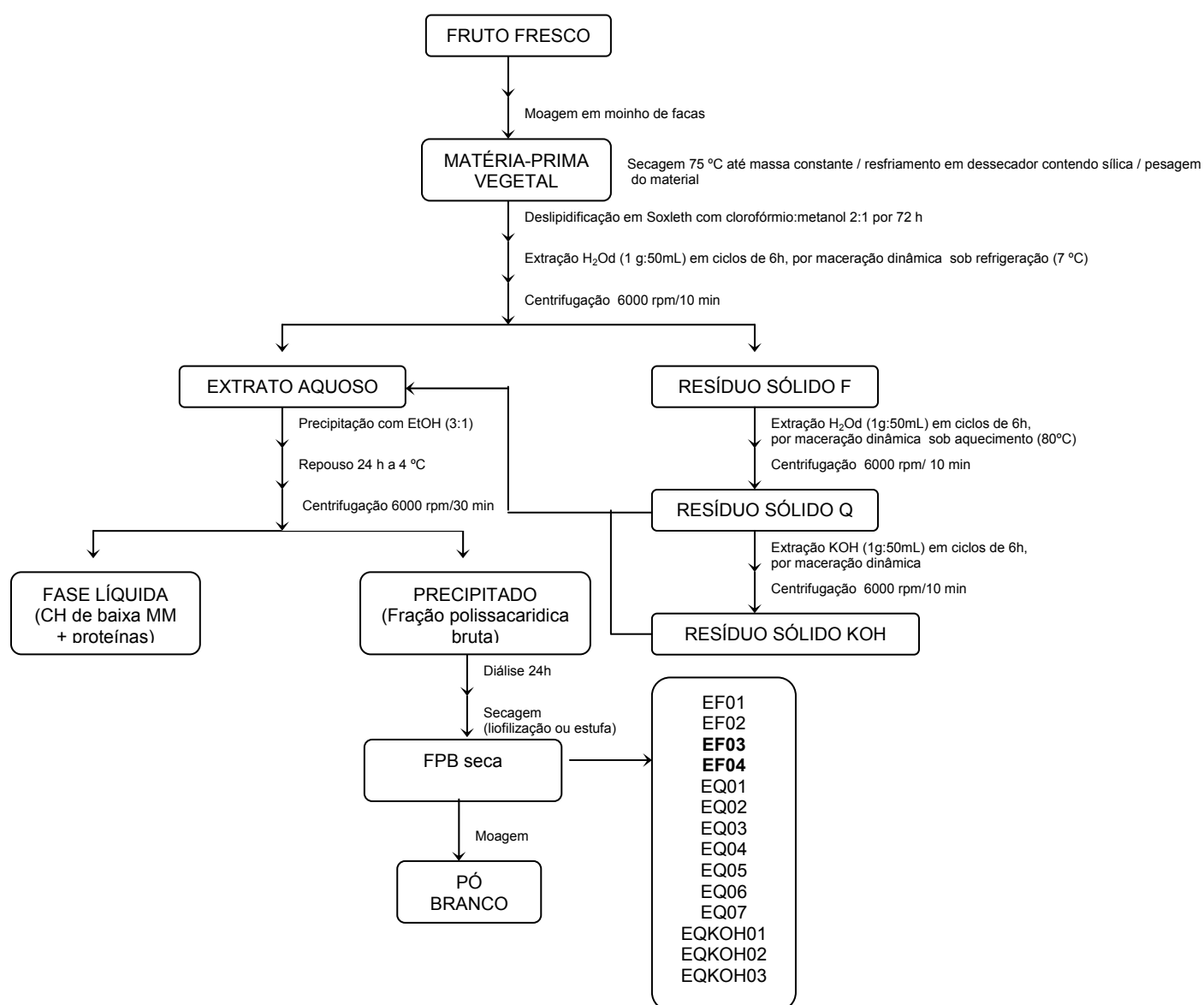


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

As frações EF03, EF04, EQ01, EQ02, EQ03, EQ04, EQ05, EQ06, EQ07, EQKOH01, EQKOH02 e EQKOH03 foram analisadas quanto a sua composição monossacarídica, por meio de cromatografia líquido-gasosa (CLG). As análises foram realizadas em cromatógrafo Hewlett-Packard 5890, com detector de ionização de chama (300 °C), injetor (250 °C), sendo utilizado nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0 mL.min⁻¹) e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25 µm). Foi utilizado, também, o cromatógrafo Thermo Eletron, modelo Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama (250° C) e

injetor (280° C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), revestida com OV-225 (0,25 μ m).

As análises dos acetatos de alditóis foram realizadas inicialmente na temperatura de 100 °C, com rampa de aquecimento de 60 °C por min, até 220 °C.

4.7 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.7.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações obtidas das extrações aquosas, EF03 e EF04 (FIGURA 9), por maceração dinâmica a frio, foram reunidas em uma única amostra e foram submetidas ao processo de purificação, por congelamento e degelo. Essas frações foram escolhidas devido ao maior rendimento e ao fato de a população utilizar a extração a frio para o preparo da planta em estudo. As frações EF01 e EF02 não foram analisadas, por conterem muitas impurezas, extraídas juntamente com os polissacarídeos.

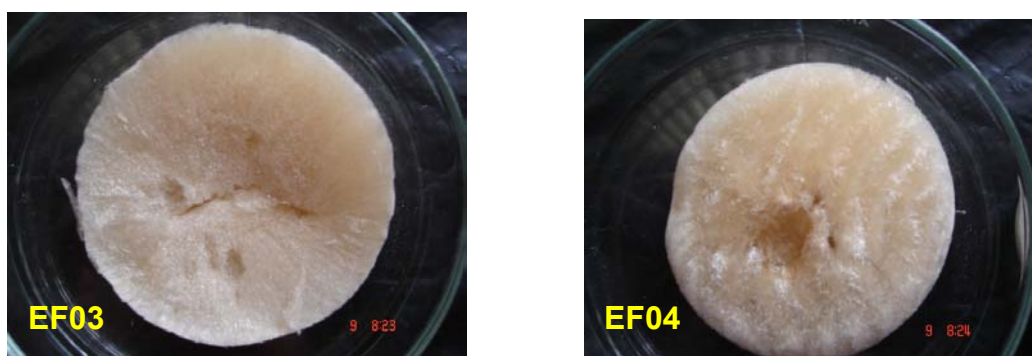


FIGURA 10 - ASPECTO DAS FRAÇÕES EF03 E EF04 LIOFILIZADAS

Cada mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao congelamento, e posterior degelo em temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis,

por centrifugação (5000 rpm, 30 min, 4 °C), segundo Baron et al. (1989), com modificações. Esse processo de purificação foi repetido, até que o sobrenadante aquoso não possibilitasse a formação de mais precipitado, por congelamento e degelo, e o resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, não apresentasse mais polissacarídeos em água fria, detectados pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após essas etapas, os sobrenadantes foram reunidos, bem como os precipitados, congelados e liofilizados. Desse processo, originaram-se duas frações: o precipitado e o sobrenadante dos ciclos de congelamento-degelo.

4.7.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água, por precipitação com solução de Fehling

Os materiais sólidos decorrentes do sobrenadante e do precipitado (item 4.7.1), resultantes dos ciclos de congelamento-degelo, a partir das frações aquosas extraídas a frio, foram dissolvidos em volume de água suficiente para solubilizá-los. Em seguida, adicionou-se igual volume de solução de Fehling. Após agitação manual vigorosa, esses materiais foram levados ao congelador durante 10 min, e à geladeira, durante 48 h. O precipitado foi separado do sobrenadante de Fehling, mediante centrifugação a 3200 rpm, durante 8 min (JONES e STOODLEY, 1965).

O precipitado de Fehling foi lavado com solução aquosa de KOH 2% (m/V), sob agitação, e centrifugado a 3200 rpm durante 8 min. Essa etapa foi realizada quatro vezes; na última, foi realizada a determinação de açúcares no sobrenadante, utilizando o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

O precipitado foi, então, lavado com metanol e centrifugado a 3200 rpm durante 8 min, por três vezes. Em seguida, o complexo cúprico insolúvel foi decomposto, por agitação, em suspensão aquosa de resina Dowex, na forma catiônica, por 1 h. Após a filtração dos polissacarídeos em solução, o pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução de NH_4OH 50% (VV). A resina foi lavada cinco vezes com água destilada, a fim de os polissacarídeos serem totalmente retirados. A solução de polissacarídeos foi concentrada, sob pressão reduzida, dialisada contra

água corrente, durante 48 h, em membrana de celulose para diálise 43 mm X 27 mm, congelada e seca por liofilização, permitindo a obtenção do rendimento.

O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético glacial, na temperatura de 0-2 °C, até pH 7,0. Em seguida, foi dialisado contra água corrente, deionizado por resina Dowex, na forma catiônica, e novamente dialisado. Após essa etapa de diálise, houve a precipitação do material, que foi centrifugado a 6000 rpm, por 30 min, para a separação do sobrenadante.

Após esse tratamento, o material sobrenadante foi concentrado, sob pressão reduzida. Ambos, precipitado e sobrenadante, foram congelados e secos por liofilização, para serem calculados seus rendimentos, e procedidas as análises de GLC, segundo os parâmetros mencionados anteriormente. A Figura 10 sumariza o procedimento de purificação dos polissacarídeos, provenientes das frações EF03 e EF04.

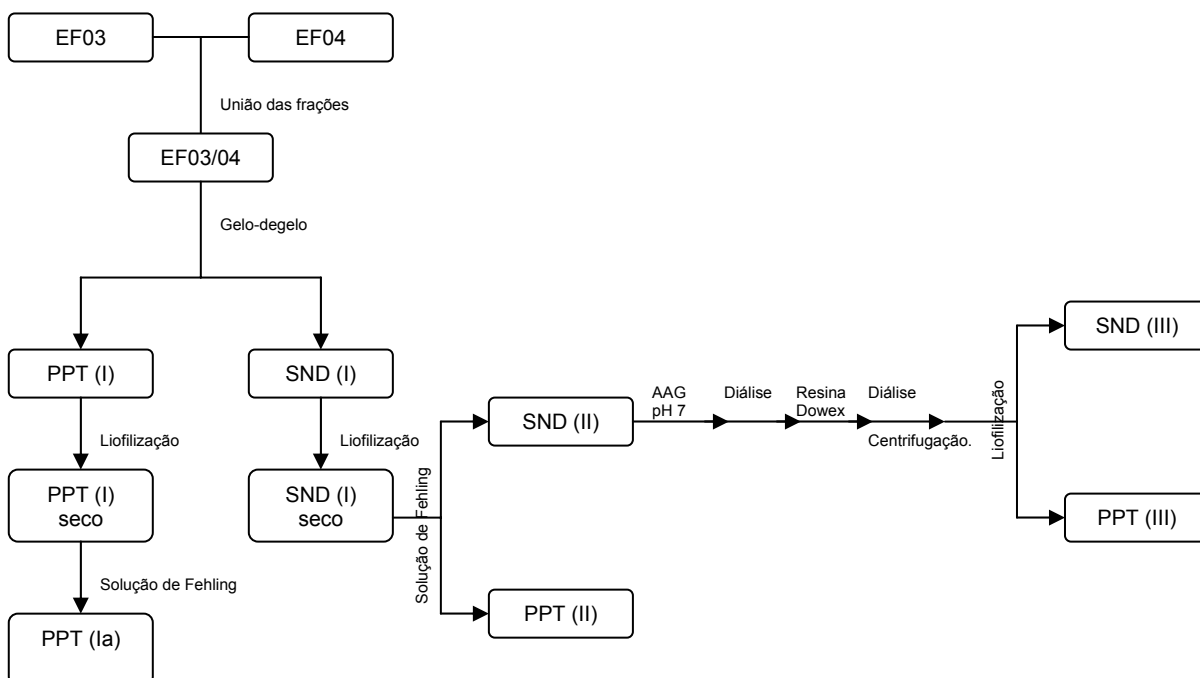


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

4.8 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A análise dos aminoácidos presentes nos frutos de maxixe foi realizada a partir de duas operações, a hidrólise das ligações peptídicas, seguida da avaliação de cada aminoácido hidrolisado resultante.

4.8.1 Preparo da amostra

O preparo da amostra foi realizado de acordo com a técnica de hidrólise para amostras com baixo teor de proteína, contendo carboidratos e/ou lipídeos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988), com modificações. Foram pesados 37,3 g do fruto inteiro fresco de maxixe, que foi picado e levado a refluxo em 100 mL de solução de HCl 6mol.L⁻¹, em ebulição constante e suave por 24 h.

Uma vez hidrolisado, o material foi resfriado até a temperatura ambiente, sendo 5 mL da solução conduzido à secura em rotaevaporador, sob temperatura máxima de 50 °C e pressão reduzida. Foi adicionado ao resíduo do balão, 10 mL de água destilada, sendo a amostra re-evaporada. Essa operação foi repetida duas vezes, até que o resíduo não apresentasse mais odor de ácido clorídrico. A película seca, formada pelo hidrolisado, foi solubilizada em tampão citrato pH 2,2 (0,20 mg.mL⁻¹ em termos de Na⁺). A solução resultante foi mantida em frasco de vidro, tampado e sob refrigeração, até a realização das análises.

4.8.2 Derivatização da amostra

Para a determinação de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi desenvolvida uma derivatização prévia da amostra com isotiocianato de fenila para que os compostos apresentassem absorção na região do UV-Vis.

O processo de derivatização (FIGURA 11) consistiu, primeiramente, na hidrólise da amostra com vapores de HCl, 6 mol.L⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio. Após a secagem a vácuo, adicionou-se uma solução contendo etanol:triethylamina:água:fenilisotiocianato, na proporção 7:1:1:1 (V/V), sob agitação em vortex. As amostras foram mantidas em repouso por 20 min, e novamente secas a vácuo, sendo redissolvidas na fase móvel para a análise cromatográfica (RIBANI e COLLINS, 2005).

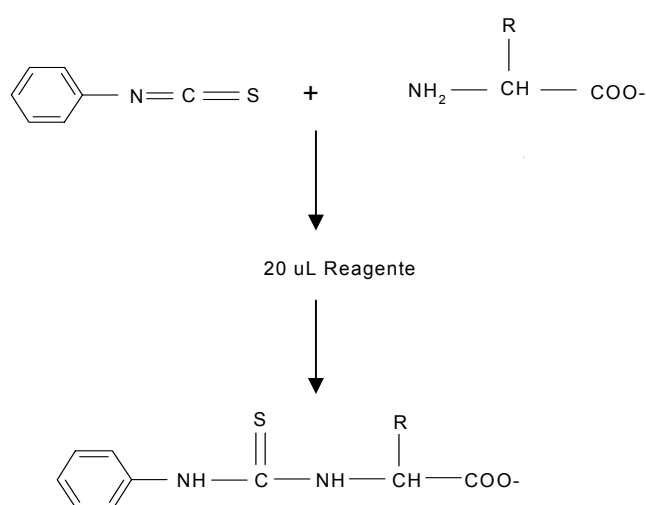


FIGURA 12 - MECANISMO DE DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

FONTE: RIBANI E COLLINS (2005)

4.8.3 Determinação de aminoácidos por CLAE

As amostras foram analisadas por CLAE em cromatógrafo, empregando as condições: coluna analítica (150 x 4,6 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 mm; fase móvel: tampão pH 6,4 (940 mL) + acetonitrila (60 mL) (A) e acetonitrila (600 mL) + água (400 mL) (B); eluição: gradiente, programação: 0% a 46% B em 10 min (1,0 mL.min⁻¹), 46% a 100% B em 0,5 min (1,0 mL.min⁻¹); 100% B por 1,5 min (1,0 mL.min⁻¹); 100% a 0% B em 0,5 min (1,5 mL.min⁻¹); 100% A por 8,5 min (1,5

mL. min⁻¹); 100 % de A em 0,5 min (1,0 mL.min⁻¹); volume de injeção: 5 mL; detecção: UV, 254 nm.

4.9 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO

4.9.1 Preparo da amostra

As cinzas das amostras foram preparadas, seguindo a técnica para a determinação de resíduo por incineração (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Foi pesado cerca de 1 g da droga e transferido para um cadinho de porcelana previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado. Cerca de 2 mL de H₂SO₄ SR foram adicionados e o cadinho aquecido brandamente, sobre chapa quente até carbonização. O material foi incinerado a cerca de 800 °C, até o desaparecimento do carvão. Após resfriamento, foi adicionado 1 mL de H₂SO₄ SR, a fim de umedecer o resíduo, que foi aquecido sobre chapa quente e, novamente, incinerado. Uma pequena quantidade de carbonato de amônio [(NH₄)₂CO₃] foi adicionada para a neutralização do ácido residual, e o material incinerado novamente até massa constante.

O material previamente preparado foi levado a um erlenmeyer, no qual foi acrescentado 20 mL de água deionizada e levado ao aquecimento, em chapa elétrica até a fervura. Iniciou-se a adição de porções de 5 mL de água régia (HCl:HNO₃, na proporção 3:1 V/V) lentamente, em capela e sem secar, observando a eliminação de fumos amarelos. A amostra foi filtrada em papel faixa preta, e recolhido em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume (INSTITUTO ADOLFO LUTZ . 2005).

A partir desse material, foram procedidas as análises para a determinação de elementos-traço.

4.9.2 Determinação de elementos-traço

Paralelamente às análises das amostras, foram realizadas análises de controles negativos, com água deionizada, ambos em triplicata.

A determinação dos elementos minerais foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica da marca Varian, modelo 250 Plus, com chama de C_2H_2 e N_2O . A TABELA 3 apresenta os dados técnicos para a análise de elementos minerais nesse equipamento de absorção atômica.

TABELA 3. DADOS TÉCNICOS PARA ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS NO EQUIPAMENTO DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Elemento	Comprimento de onda (VAN LOON et al.)	Largura da fenda (unidades mm)	Tipo de chama	Faixa de Calibração (ppm)	Corrente da lâmpada (mA)	Supressor de ionização
Cd	228,8	0,5	C_2H_2	0,5 – 2,0	6	—
Cr	357,9	0,2	C_2H_2	0,5 – 2,0	7	—
Cu	324,7	0,5	C_2H_2	0,5 – 2,0	4	—
Fe	248,3	0,2	C_2H_2	1,0 – 1,0	5	—
Ni	232,0	0,2	C_2H_2	0,5 – 2,0	4	—
Pb	217,0	1,0	C_2H_2	0,5 – 2,0	5	—
Zn	213,9	1,0	C_2H_2	0,5 – 2,0	5	—
Mn	279,5	0,5	C_2H_2	0,5 – 2,0	5	—
Al	309,3	10,5	N_2O	1-10	10	KNO_3
Ca	422,7	0,5	N_2O	1-10	10	SrCl
K	766,5	1,0	C_2H_2	1-10	5	SrCl
Mg	285,2	0,5	N_2O	1-10	4	$SrCl_2$

FONTE: WASTEWATER (1998)

4.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.10.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato aquoso dos frutos de *Cucumis anguria* L. foi determinada através de dois métodos bastante difundidos na literatura: o método

do fosfomolibdênio e o método do radical DPPH• (BLOIS, 1958; PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

4.10.1.1 Avaliação da capacidade antioxidante pela formação de um complexo de fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio para a determinação da capacidade antioxidante total, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V) pela amostra analisada com subsequente formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm (ADELMANN, 2005).

Uma alíquota de 300 µL da amostra de maxixe em solução aquosa a 200 µg.mL⁻¹, foi acrescentada em tubo de ensaio juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mmol.L⁻¹, fosfato de sódio 28 mmol.L⁻¹, ácido sulfúrico 0,6 mol.L⁻¹). Os tubos foram fechados hermeticamente e incubados em banho-maria a 95 °C, por 90 min.

Após resfriamento, a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, a 695 nm contra um branco (300 µL do mesmo solvente empregado para a amostra acrescido de 3 mL do reagente). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e a rutina em concentração de 200 µg.mL⁻¹, mantidos nas mesmas condições de análise. Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação aos padrões (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999), conforme indicado na EQUAÇÃO 1.

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR%) PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO

$$AAR\% = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}).100}{(Abs_{padrão} - Abs_{branco})}$$

4.10.1.2 Método da reatividade contra o radical livre estável DPPH•

O radical livre DPPH• é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm e sua solução possui uma coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO, 2000).

Conforme o DPPH• vai sendo reduzido por uma substância antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

As amostras de DPPH• em solução metanólica foram preparadas momentos antes de serem utilizadas. Uma alíquota de 1 mL da solução de DPPH• $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi adicionada a 3 mL de extrato aquoso de maxixe, nas concentrações finais de 297 a $476 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mantidos em repouso, na temperatura ambiente, durante 30 min, na ausência de luz. Como os extratos possuíam uma leve coloração, todas as leituras foram subtraídas da absorvância de seus respectivos brancos (amostra sem adição de solvente ou reagente). Como controle, foi utilizada uma solução contendo 3 mL de água e $100 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de DPPH• $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Todas as reações foram feitas em triplicata e nas mesmas condições de análise (30 minutos, $25 \text{ } ^\circ\text{C}$). Após o tempo reacional, as absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em comprimento de onda de 515 nm, sendo os valores de absorvância convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ($\text{IC}_{\%}$), de acordo com a EQUAÇÃO 2. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de ácido ascórbico. A expressão dos resultados foi dada pela IC_{50} (em mg.mL^{-1}), obtida com o auxílio da equação da reta, interpolada a partir dos dados de concentração (eixo das abscissas) e de $\text{IC}_{\%}$ (eixo das ordenadas), substituindo o valor de y por 50, para a determinação da concentração de amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH•.

EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (IC%) PELO MÉTODO DA REATIVIDADE CONTRA O RADICAL ESTÁVEL DPPH•

$$IC_{\%} = 100 - \left(\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \cdot 100}{Abs_{Controle}} \right)$$

4.10.1.2.1 Determinação do IC₅₀ dos padrões, ácido ascórbico (AA) e rutina

Foi preparada uma solução de AA, nas concentrações de 0,078 a 5 µg.Ml⁻¹, e rutina, nas concentrações de 0,625 a 10 µg.mL⁻¹ em etanol, que foram submetidas ao mesmo procedimento experimental e de análise das amostras.

4.10.2 Atividade citotóxica

4.10.2.1 Preparo da amostra

Os frutos inteiros frescos de *Cucumis anguria* L. foram picados e submetidos à extração, em meio aquoso e em meio metanólico a 70% (V/V), por maceração simples à quente (~ 60 °C em BM), *overnight*. Os extratos a 20% (m/V) primeiramente foram filtrados por algodão, a quente, e novamente filtrados por membranas de 0,45 µm, sob fluxo laminar. Esses extratos foram preparados pelo método de diluição 1:2, empregando o próprio meio de cultivo.

O extrato aquoso foi testado com a finalidade de avaliar a segurança para sua utilização como terapia complementar no DM tipo 2, considerando a sua aplicação pela população. O extrato metanólico foi testado com o propósito de

verificar sua citotoxicidade, uma vez que as cucurbitacinas – extremamente tóxicas e, possivelmente, presentes na amostra - são solúveis em metanol.

4.10.2.2 Cultivo celular

Células de traquéia fetal bovina, obtidas de embriões bovinos abortados, foram cultivadas em meio de cultura Médium 199 (Gibco), enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100 UI.mL⁻¹ de penicilina, 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina e 2,5 µg.mL⁻¹ de anfotericina B (MOREIRA, WEISS e KRÜGER, 2000). A cultura foi obtida do Laboratório Marcos Enrietti, de Curitiba (Paraná).

As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultivo, em estufa de cultivo celular, a 28 °C e saturação máxima de CO₂ de 5%.

O estudo foi realizado em placas de cultivo com 96 poços, com diluições em série de base 10, de 1.10⁻¹ a 1.10⁻²⁴ em meio de cultivo, com 12 repetições.

4.10.2.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Foram dissolvidos 100 µL de extrato aquoso e metanólico a 20 % (m/V) em 900 µL de meio de cultura, perfazendo a primeira diluição, de 1.10⁻¹; as diluições sucessivas foram de base 10, até 1.10⁻²⁴, em meio de cultivo, considerando as 12 repetições.

As diluições de 1.10⁻²⁴ foram empregadas como controle negativo e uma solução de metanol 80% (V/V) foram testados, a fim de rastrear o efeito tóxico do solvente.

Em cada diluição, e suas respectivas repetições, foram aplicados 50 µL de suspensão de células, totalizando 300000 células.mL⁻¹ por placa.

A observação da evolução dos cultivos celulares, submetidos aos extratos, nas diferentes diluições estudadas, foi realizada em intervalos de 24 h, durante 4 dias, com auxílio de microscópio invertido Olympus binocular.

4.10.3 Atividade Hipoglicemiante

Ratos machos Wistar, pesando entre 230 e 360 g, foram mantidos sob condições controladas (22 ± 2 °C), em ciclos de claro/escuro invertido de 12 h, *standard laboratory chow* e água *ad libitum*.

Nos dias de véspera à indução do *Diabetes*, os animais foram mantidos em jejum e restrição de água por 12 h. A indução foi realizada com injeções de estreptozotocina (STZ) a 45 mg.Kg^{-1} , através da veia peniana dos animais. A solução de STZ foi preparada antes do uso, em tampão citrato pH 4,8 (YAMASAKI, 2005).

Os animais foram mantidos sob condições controladas, durante sete dias, a fim de garantir a estabilização do quadro hiperglicêmico.

No sétimo dia após a indução, os animais foram subdivididos em um grupo controle e dois grupos de intervenção. O grupo controle recebeu água destilada por gavagem, com o propósito de acompanhar o estresse promovido pela intervenção, mas sem a presença de testes. O primeiro grupo teste recebeu 1 mL de extrato recém-preparado conforme a utilização popular, a 320 mg.mL^{-1} . O segundo grupo recebeu 1 mL do extrato a $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ por gavagem. As doses foram estabelecidas em relação ao peso médio dos animais.

A mensuração da glicemia dos animais foi feita por meio do sistema de monitorização Accu Check Go (Roche), amplamente utilizado para esta finalidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

A abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico a 20% (V/V) de frutos inteiros de maxixe revelou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários. Dentre os compostos encontrados foi verificada a presença de heterosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, taninos e aminogrupos. Esses resultados corroboram com aqueles relatados em estudos anteriores, nos quais também foram detectadas as classes de substâncias mencionadas (SALAMA et al., 1986). A determinação foi negativa para alcalóides, leucoantocianidinas, cumarinas, glicosídeos antraquinônicos, glicosídeos cianogenéticos, glicosídeos antociânicos, ácidos voláteis e ácidos fixos.

A presença de glicosídeos flavônicos foi avaliada, segundo quatro diferentes métodos. Por meio da reação de Shinoda, em que os heterosídeos flavônicos reagem com o magnésio em meio ácido, foi observado ausência de coloração. Esse resultado permite indicar tanto a ausência desses compostos, como a presença de chalconas, auronas, diidrochalconas, isoflavonas e/ou isoflavanonas, que não apresentam coloração, quando conduzidas a esse ensaio.

As frações submetidas à reação de Taubock, também conhecida como teste do oxálico-bórico, apresentaram diferentes comportamentos. A fração hexânica não revelou fluorescência ao ser observada em lâmpada UV. Esse resultado pode ser indicativo de ausência de heterosídeos flavônicos ou da presença de flavanonas e/ou isoflavonas. As frações diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica mostraram fluorescências de coloração esbranquiçada, azulada e amarelada, respectivamente. Esses dados permitem estabelecer a presença de flavonóides na espécie *C. anguria*.

Das frações conduzidas ao ensaio de Pacheco, apenas a acetato de etila apresentou coloração roxa característica, indicando a presença de dihidroflavonóis. As demais frações não revelaram coloração, indicando a ausência de glicosídeos flavônicos ou possível presença de flavonas, chalconas, auronas e flavonóis, que não possuem coloração.

Nenhuma das frações submetidas ao ensaio com zinco em HCl desenvolveram coloração, também indicando a possibilidade de não haver glicosídeos flavônicos na amostra ou a presença de flavononas e/ou flavanol, que não produzem coloração quando submetidas a essa reação. Esses resultados estão resumidos na TABELA 4.

TABELA 4 – ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE GLICOSÍDEOS FLAVÔNICOS

FRAÇÃO	REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO			
	Reação com Mg	Reação de Taubock	Ensaio de Pacheco	Ensaio de Zn em HCl
HEX	SF	SF	SF	SC
DM	SF	F (esbranquiçada)	SF	SC
AE	SF	F (azulada)	F (roxa)	SC
HA	SF	F (amarelada)	F (incolor)	SC

NOTAS: F – com fluorescência; SC - sem coloração SF; – sem fluorescência

Dessa forma, verifica-se que os flavonóides que ocorrem em *C. anguria* podem pertencer aos grupos chalconas, auronas, diidrochalconas, isoflavonas, isoflavononas, flavanonas e flavonóis.

A presença de esteróides e/ou triterpenos foi avaliada segundo oito diferentes reações. Todas as frações submetidas à reação de Libermann Bouchard apresentaram coloração amarelada. Isso indica que o composto majoritário que reagiu, possivelmente, tem um grupamento metila em C₁₄. Todas as frações conduzidas à reação de Keller Kelliani não manifestaram alteração de coloração, indicando a ausência de desoxi-açúcares. Uma vez avaliadas pela reação de Baljet, todas as frações revelaram coloração laranja, o que indica a presença de geninas com anel lactônico pentagonal insaturado. Um segundo método que identifica a presença de geninas com anel lactônico insaturado é a reação de Kedde, ao desenvolver coloração violácea ou azul que desaparece após o período de uma hora. Em nenhuma das frações testadas foi observada a coloração mencionada.

As lactonas α,β - e β,δ -insaturadas reduzem o reativo de Tollens formando um espelho de prata. As α,β - e β,δ - são diferenciadas quando da adição de NaOH, uma vez que as segundas, por serem fortes redutores, são capazes de oxidar o reativo na ausência da base. Como a formação do espelho de prata não ocorreu na ausência de NaOH, a possível forma dessas lactonas é a α,β - insaturadas no anel A

ou B. A ausência de lactonas β,δ -insaturadas e, também, de metilcetonas foi comprovada através da ausência da formação de coloração rósea característica para todas as frações testadas, segundo a reação de Legal.

Para a reação de Xantidrol, apenas a fração HEX apresentou coloração amarela.

As frações submetidas a reação de Raymond desenvolvem coloração violácea ou azulada que desaparece rapidamente para grupos metileno ativo e anel α lactônico insaturado. Nenhuma das frações testadas mostrou a coloração mencionada e, portanto, os grupamentos químicos relacionados. A TABELA 5 apresenta os ensaios fitoquímicos para esteróides e triterpenos.

TABELA 5 – ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENOS

FRAÇÃO	REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO PARA ESTERÓIDES E/OU TRITERPENOS									
	Libermann Bouchard			Keller Kelliani	Baljet	Tollens	Kedde	Xantidrol	Raymond	Legal
	0,1	0,5	1,0							
HEX	A	A	A	SC	L	SEP	SC	A	SC	SC
DM	A	A	A	SC	L	SEP	SC	SC	SC	SC
AE	A	A	A	SC	L	EP	SC	SC	SC	SC
HA	A	A	A	SC	L	EP	SC	SC	SC	SC

NOTAS: A – coloração amarela; EP – espelho de prata; L – coloração laranja; SC – sem coloração; SEP – sem espelho de prata.

As frações aquosas, submetidas aos ensaios do cloreto férrico e de sulfato de ferro amoniacal, desenvolveram coloração verde, característica para taninos. Para a reação da gelatina, houve a formação de precipitado, enquanto que os ensaios da emetina, do dicromato de potássio e do formol clorídrico não apresentaram resultados positivos. Na presença de cianeto de potássio e do ácido nitroso, a fração aquosa assumiu coloração rósea caracterizando, respectivamente, a presença de ácido gálico e elágico (TABELA 6).

TABELA 6 – ENSAIO FITOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS

REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO PARA TANINOS									
FeCl ₂	Gelatina			NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	Emetina	KCN	HNO ₂	K ₂ Cr ₂ O ₄	Formol Clorídrico
	0,5	1,0	2,0						
V	P	P	P	V	SP	R	R	SP	SC

NOTAS: P – precipitado; R - coloração rósea; SC – sem coloração; SP – sem precipitado; V – coloração verde.

Assim, a maioria dos ensaios qualitativos permitiu comprovar a presença de taninos nos frutos de maxixe.

5.2 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

Embora o método mais preciso e exato para a quantificação de flavonóides seja por CLAE, a quantificação por espectrofotometria UV-Vis empregando o cloreto de alumínio, também é bastante aceita e difundida (ADELMANN, 2005). Isso porque consiste em um método preciso, ou seja, reprodutível e que fornece desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra.

A FIGURA 12 demonstra a curva analítica para a substância padrão rutina, no doseamento de flavonóides.

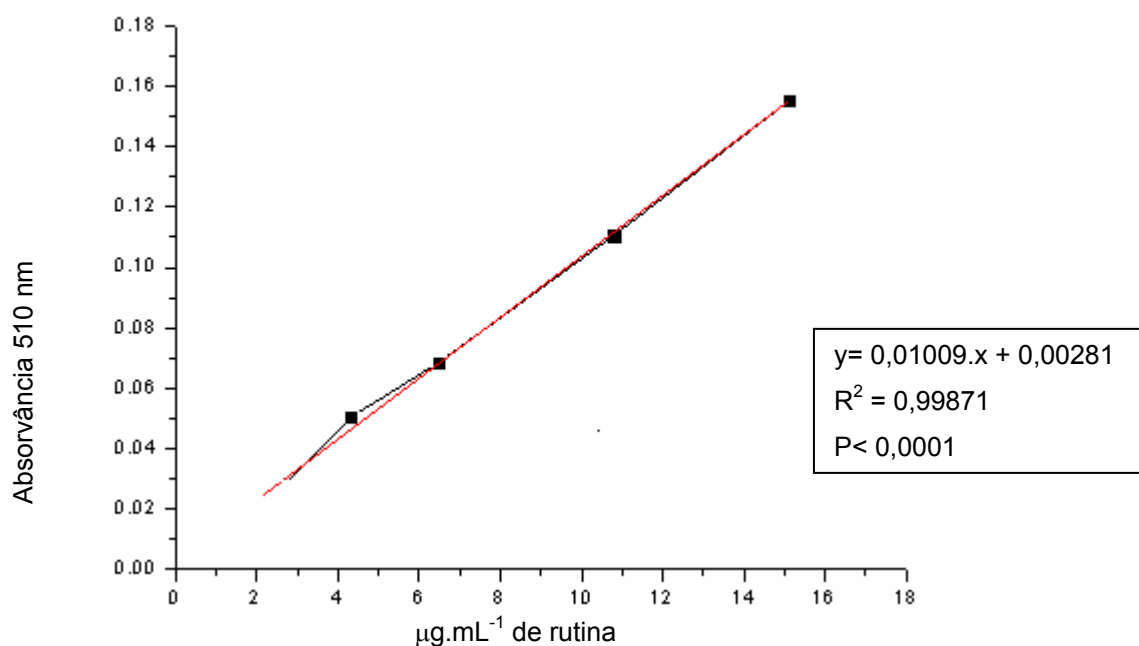


FIGURA 13 - CURVA ANALÍTICA PARA A SUBSTÂNCIA PADRÃO RUTINA, NO DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES

A equação da reta $y = 0,01009.x + 0,00281$, fornecida pela curva analítica, permitiu o cálculo da concentração de flavonóides contidos nos frutos de maxixe, em $\mu\text{g}\%$ de rutina. Os teores de flavonóides totais, para as 10 amostras dos extratos aquosos, preparados segundo a forma de utilização popular, estão representados na TABELA 7.

TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS AQUOSOS DE MAXIXE (200 mg.mL^{-1})

AMOSTRA	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g RUTINA/FRUTO}$ (40 g PLANTA FRESCA)	$\mu\text{g}\% \text{ RUTINA}$
01	5,78	231,44	578,59
02	6,58	263,15	657,88
03	5,78	231,44	578,59
04	6,58	263,15	657,88
05	5,19	207,65	519,13
06	4,59	183,87	459,66
07	4,00	160,08	400,20
08	4,79	191,79	479,48
09	3,60	144,22	360,55
10	3,21	128,36	320,91
MÉDIA	5,01	200,52	501,29

Em média as amostras apresentaram $501,29 \pm 96,56 \mu\text{g}\%$ de flavonóides em plantas frescas, expressos como equivalente de rutina.

As amostras foram analisadas conforme Teste Q (teste de rejeição) e o nível de confiança foi de 99% para o intervalo de confiança referência (SKOOG, WEST e HOLLER, 1996).

Segundo a literatura, como a estrutura química dos flavonóides determina a intensidade da cor, a partir da complexação com Al^{3+} , o teor de flavonóides pode ser subestimado em amostras ricas em flavanonas (ADELMANN, 2005).

5.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A equação da reta $y = 0,10412x + 0,05081$ obtida a partir da curva analítica de ácido gálico (FIGURA 13), permitiu o cálculo dos teores de polifenóis totais, expressos em $\mu\text{g}\%$ de ácido gálico, nas amostras de maxixe.

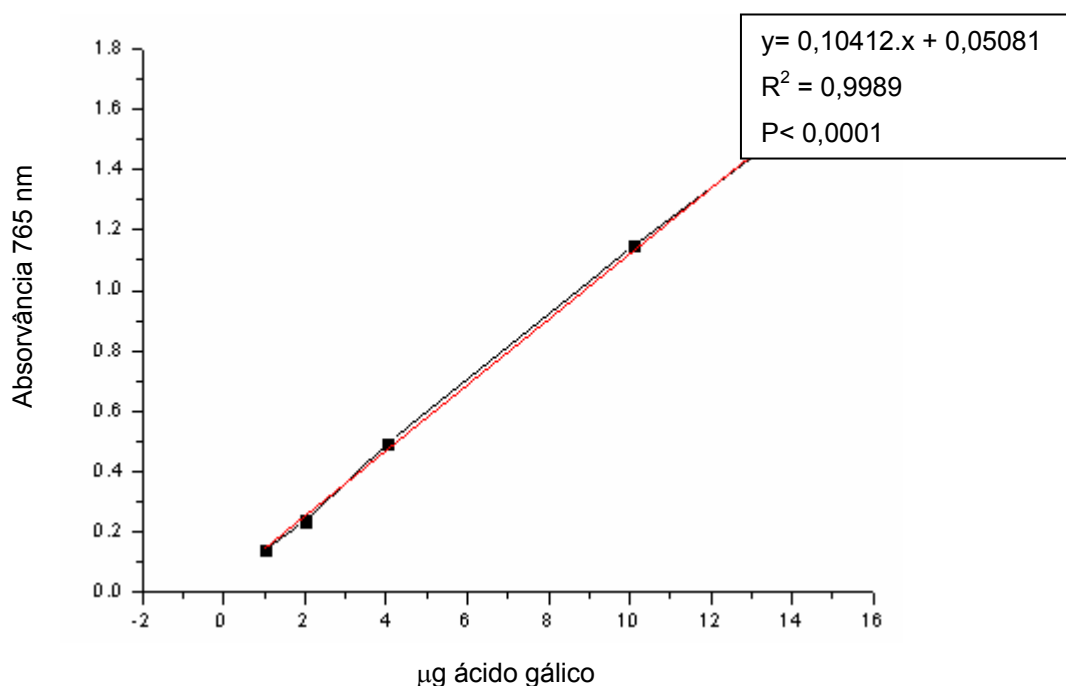


FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA PARA A SUBSTÂNCIA PADRÃO ÁCIDO GÁLICO, NO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os teores de fenólicos totais, para as 10 amostras do extrato aquoso de *C. anguria*, preparados conforme a utilização popular, estão mostrados na TABELA 8.

TABELA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE MAXIXE (200 mg.mL⁻¹)

AMOSTRA	µg.g ⁻¹	µg ÁCIDO GÁLICO/FRUTO (40 g PLANTA FRESCA)	µg% ÁCIDO GÁLICO
01	24,65	985,93	2464,83
02	24,94	997,47	2493,64
03	23,57	942,90	2357,26
04	23,90	955,97	2389,92
05	25,11	100,37	2510,93
06	22,23	889,12	2222,80
07	31,85	1274,06	3185,15
08	23,73	949,05	2372,63
09	23,34	933,68	2334,21
MÉDIA	24,81	992,51	2481,26

Em média as amostras apresentaram 2481,26 ± 239,55 µg% de fenólicos em plantas frescas, expressos como equivalentes de ácido gálico.

As amostras foram analisadas conforme Teste Q (teste de rejeição) e o nível de confiança foi de 99% para o intervalo de confiança referência (SKOOG, WEST e HOLLER, 1996).

5.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Após a realização das etapas de extração, foram calculados os rendimentos e determinada a composição monossacarídica, por cromatografia líquido-gás (GLC), das frações obtidas. Os resultados estão sumarizados na TABELA 9.

TABELA 9 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES RESULTANTES DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Cucumis anguria* L.

Fração	Rendimento(g%)	Composição monossacarídica ^b							
		RHA	FUC	RIBOSE	ARA	XYL	MAN	GAL	GLC
EF01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EF02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EF03	1,0	4,5	0,7	0,5	17,8	11,6	3,2	51,1	10,5
EF04	0,5	4,4	-	-	10,9	8,2	13,8	49,2	13,4
	1,5								
EQ01	1,5	7,3	-	-	14,2	5,6	2,5	61,7	8,7
EQ02	0,5	8,6	-	-	16,6	6,5	2,8	57,3	8,2
EQ03	1,4	4,3	0,29	0,5	9,8	3,1	1,7	73,2	5,9
EQ04									
EQ05-S	0,4	5,1	-	0,6	17,8	19,7	3,3	46,6	6,9
EQ05-I	0,1	3,0	-	1,2	15,6	8,9	7,9	54,9	8,4
EQ06	0,8	10,9	0,7	-	3,7	2,6	14,6	39,3	28,1
EQ07	0,3	6,1	0,6	0,4	7,7	2,4	4,0	73,6	5,2
	5,0								
EQKOH01	1,3	3,1	2,9	1,9	4,0	18,8	14,9	35,0	19,4
EQKOH02	1,0	2,8	3,1	4,1	4,3	6,7	51,9	15,1	11,9
EQKOH03	0,4	1,8	1,3	2,3	4,5	5,4	61,9	8,6	14,4
	2,7								

NOTA: ^aRendimento calculado com base na massa total da amostra seca (194 g), sem tratamento prévio com clorofórmio:metanol. ^bPor GLC, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40°C – 220°C

Os dados demonstram uma diferença substancial nos rendimentos para cada etapa de extração. Observa-se que as extrações a frio, considerando as frações EF03 e EF04, apresentaram menor rendimento (1,5 g%). As frações EF01 e EF02 não foram analisadas, por revelarem aspecto indicativo da presença de inúmeros contaminantes, com coloração bastante escura e não característica de polissacarídeos. As extrações com KOH tiveram rendimento intermediário (2,7 g%) e as extrações a quente forneceram o maior rendimento (5 g%). Entretanto, apesar dessas extrações a quente terem conduzido ao maior rendimento, as frações da extração a frio foram priorizadas para dar o prosseguimento do trabalho, devido ao fato de a população utilizar a espécie na forma de suco.

O interesse em avaliar os polissacarídeos presentes nos frutos de maxixe foi decorrente do fato de que essa planta possui esses compostos em quantidade expressiva, por não haver estudos conclusivos a esse respeito e, especialmente, por espécies pertencentes a mesma família terem polissacarídeos isolados, identificados e com atividade confirmada sobre a homeostase glicêmica.

As frações extraídas, empregando água destilada a 80 °C e KOH 1% (m/V) a 100 °C foram reservadas para estudos futuros.

A fração EF03 apresentou maior rendimento (1,0 g%), quando comparada a EF04 (0,5 g%). As extrações sequenciais, a quente, tiveram rendimentos variáveis, concentrando a maior % de material extraído (3,4 g%) nos três primeiros ciclos extrativos, com composição monossacarídica também diversificada.

Uma vez que as amostras apresentaram uma composição monossacarídica bastante ampla, fez-se necessário a sua purificação.

A etapa de purificação das frações EF03 e EF04 foi feita por meio da solução de Fehling, resultando nas subfrações e nos respectivos rendimentos resumidos na TABELA 10.

TABELA 10 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS PURIFICADOS POR SOLUÇÃO DE FEHLING

Fração	Rendimento(g%)	Composição monossacarídica ^b							
		RHA	FUC	RIBOSE	ARA	XYL	MAN	GAL	GLC
PPTII	0,01	1,920	2,943	0,765	10,698	10,698	1,476	75,543	3,132
SNDII	0,19	0,845	0,510	0,040	23,010	13,672	1,100	57,072	3,752
SNDIII	0,10	1,582	7,219	1,028	32,124	18,925	2,457	26,229	10,436
PPTIII	0,13	2,863	0,724	0,454	29,148	23,971	1,193	37,124	4,525
	0,43								

NOTA: ^aRendimento calculado com base na massa total da amostra seca (194 g) sem tratamento prévio com clorofórmio:metanol. ^bPor GLC, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40°C – 220°C

Com a purificação, foi observado o predomínio dos monossacarídeos arabinose, xilose e manose, em todas as subfrações analisadas. Esses resultados ainda não são conclusivos, pois as amostras PPTII, SNDII, SNDIII e PPTIII dependem de análises de identificação complementares.

5.5 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

As análises da composição aminoacídica das amostras de maxixe mostram a presença de 17 aa identificados no fruto fresco, no ponto de maturação habitualmente consumido.

Dos quatro aa com comprovada influência sobre a homeostase glicêmica (Arg, Leu, Ileu, Ala) (NEWSHOLME et al., 2005), todos foram verificados na amostra avaliada, conforme ilustrado na FIGURA 14 e sintetizado na TABELA 11.

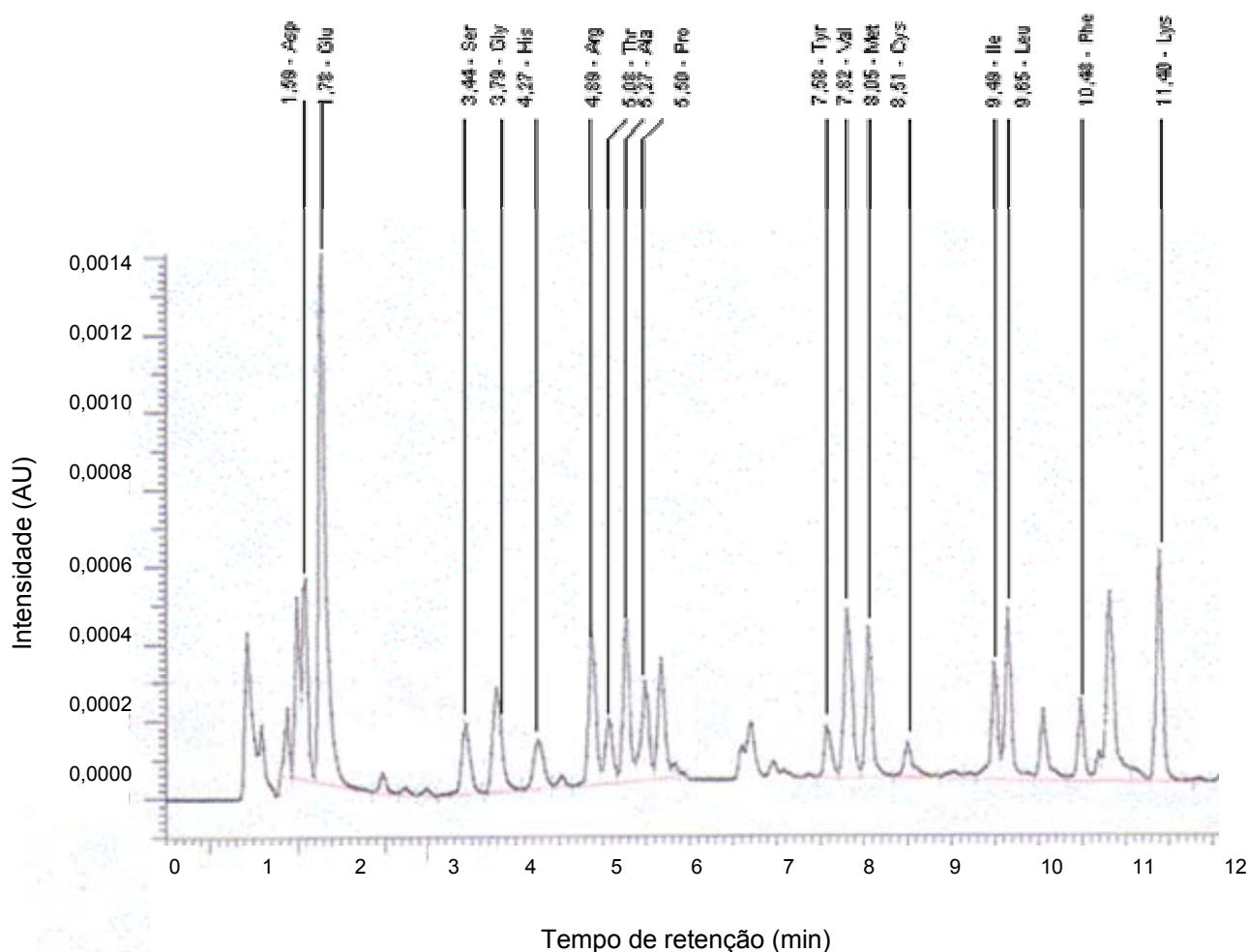


FIGURA 15 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA DO FRUTO DE MAXIXE, EM MATURAÇÃO USUAL PARA CONSUMO

TABELA 11 – AMINOÁCIDOS PRESENTES NO FRUTO DE MAXIXE

AMINOÁCIDOS	$\mu\text{g.Ml}^{-1}$	%	aa/g de fruto fresco	mg/fruto (~41 g)
Asparagina	161,5	6,7	432,9 μg	17,7
Glutamina	596,9	24,8	1,6 mg	65,6
Serina	59,9	2,5	160,6 μg	6,5
Glicina	160,0	6,6	429 μg	17,5
Histidina	89,2	3,7	239 μg	9,7
Arginina	182,9	7,6	490,3 μg	20,1
Treonina	53,7	2,2	143,9 μg	5,8
Alanina	90,5	3,7	242,6 μg	9,9
Prolina	84,8	3,5	227,3 μg	9,3
Tirosina	58,2	2,4	156 μg	6,3
Valina	299,7	12,4	803,5 μg	32,9
Metionina	136,2	5,6	365,1 μg	14,9
Cistina	32,5	1,3	87,1 μg	3,5
Isoleucina	89,1	3,7	238,9 μg	9,7
Leucina	123,9	5,1	332,2 μg	13,6
Fenilalanina	77,3	3,2	207,2 μg	8,4
Lisina	124,3	5,1	333,2 μg	13,6
TOTAL	2403,5	100	6,5 mg	265

NOTA: o extrato analisado apresentou concentração igual a 373 mg.mL⁻¹

Dessa forma, a quantidade diária de aminoácidos ingeridos pelos pacientes que utilizam um fruto ao dia, é de 265 mg, em média. Desses, 7,6% correspondem à *L*-arg; 3,7% à *L*-ala; 3,7% à *Ile* e 5,1% à *L*-leu.

Além desses aa, também foi determinada a presença de fenilalanina e, em especial, elevada concentração de glutamina.

A ingestão de fenilalanina e leucina, concomitantemente, promove um efeito positivo para o aumento da secreção de insulina (VAN LOON et al., 2003).

A glutamina, embora prontamente consumida pelas células β , não estimula a secreção de insulina na ausência da ativação alostérica da enzima glutamato desidrogenase (GDH) e, tampouco, potencializa a secreção de insulina glucose-induzida. A *L*-leucina, no entanto, pode favorecer a secreção de insulina estimulada pela glutamina por atuar como ativador alostérico da GDH (SENER e MALAISSE, 1980). As moléculas de glutamina, sabidamente, são convertidas a moléculas de ácido γ -aminobutírico (GABA) nas ilhotas pancreáticas, sendo que essa conversão pode explicar o efeito paradoxal da glutamina isoladamente não estimular a liberação de insulina. A liberação de GABA pelas células β pancreáticas pode regular a liberação de glucagon pelas células α via ocupação do receptor GABA_A, liberação de glucagon, glutamato e subsequente ativação do seu receptor (AMPA), conforme sugerido por Moriyama e Hayashi (2003) (MORIYAMA e HAYASHI, 2003).

Portanto, a partir das análises de identificação e de quantificação dos aa, não foi possível mensurar a dimensão do efeito modulatório desses compostos. Porém, a influência dos aa não pode ser descartada, uma vez que a literatura relata o envolvimento dessas substâncias na regulação da homeostase glicêmica.

5.6 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO

Até o presente momento, os dados obtidos (TABELA 12) não contemplam a totalidade da análise, que está em andamento e, portanto, ainda não são conclusivos.

TABELA 12 - RESULTADOS PARCIAIS DOS ELEMENTOS-TRAÇO PRESENTES EM *Cucumis anguria* L.

Amostra	Ca (mg.L ⁻¹)	Mg (mg.L ⁻¹)	Mo (mg.L ⁻¹)	Ni (mg.L ⁻¹)
A01	21,27	11,21	<2,0	<0,10
A02	49,40	36,10	<2,0	<0,10
A03	34,90	28,60	<2,0	<0,10
Controle 01	4,57	1,25	<2,0	<0,10
Controle 02	27,63	11,33	<2,0	<0,10

5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.7.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é um parâmetro amplamente utilizado para caracterizar diferentes materiais biológicos, com relação à presença de compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos nocivos da oxidação excessiva, por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ARNAO, 2000).

A potência dessa atividade é determinada diretamente, pela reatividade do antioxidante contra o radical, pela concentração em que o antioxidante está presente e, também, pelo seu espectro de ação, o qual é modulado pela sua solubilidade (NIKI, 2002).

5.7.1.1 Avaliação da capacidade antioxidante total, por meio da formação do complexo de fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma forma simples e econômica para a avaliação da capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso do maxixe. Possui a grande vantagem de avaliar a capacidade antioxidante, tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (ADELMANN, 2005).

Os resultados obtidos no sistema de redução do complexo fosfomolibdênio indicam que o extrato, nas condições testadas, não possui AAR% considerável, sendo inferior ao padrão de ácido ascórbico. Para o extrato aquoso de maxixe na concentração de 200 mg.mL^{-1} , a média da AAR% foi igual a 6%, em relação a 100% do total da atividade antioxidante atribuída ao ácido ascórbico e 12,9%, em relação a 100% do total da atividade antioxidante atribuída a rutina. Esse resultado evidencia que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem pequena disponibilidade eletrônica, capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênio, ou as substâncias antioxidantes estão em pequena concentração na amostra.

5.7.1.2 Método da reatividade das amostras de maxixe frente ao radical livre DPPH•

O sistema-modelo de seqüestro do radical livre DPPH• é um método simples para se avaliar a atividade anti-radical livre de compostos antioxidantes. Entretanto, esse procedimento tem uma importante limitação para a interpretação da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos, uma vez que o DPPH• é solúvel apenas em meio orgânico (especialmente etanol e metanol) e não em meio aquoso (ARNAO, 2000).

5.5.1.2.1 Cinética da reação de consumo do DPPH•

A evolução da cinética de reação depende, diretamente, da natureza do antioxidante em questão. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos para as diferentes amostras: cinética rápida, quando reagem rapidamente com o DPPH•, atingindo o final da reação em menos de 1 min; cinética intermediária, quando o final da reação é atingido em até 30 min e cinética lenta, quando a reação demora mais de 1 h para finalizar (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSSET, 1995).

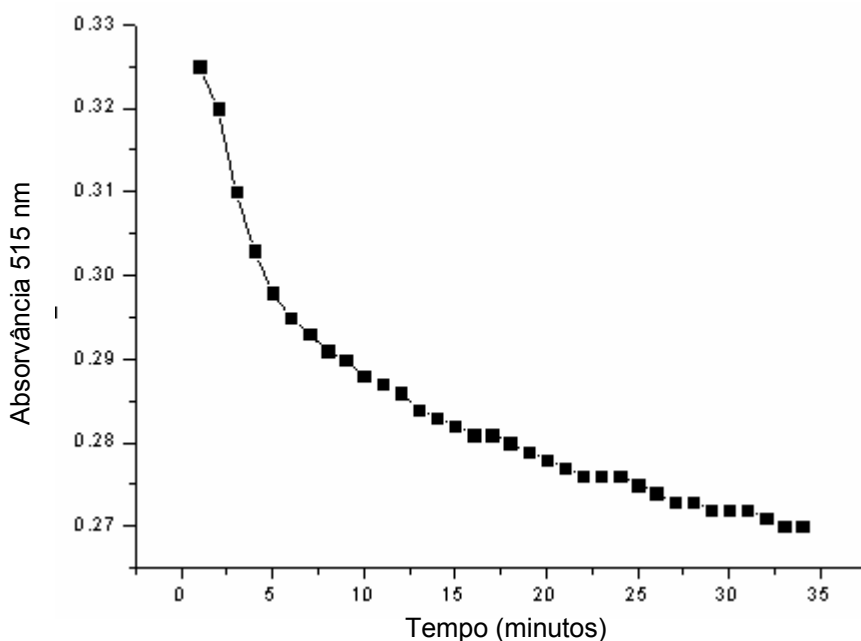


FIGURA 16 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH• PELO EXTRATO AQUOSO ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) DE MAXIXE, EXTRAÍDO À TEMPERATURA AMBIENTE

Segundo a FIGURA 16, a cinética da reação do consumo do radical livre DPPH• é bastante lenta, na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, quando comparado a dados de literatura.

É importante notar que a amostra analisada não anulou totalmente a absorvância do radical livre testado. Esse fato pode ser decorrente de alguns

produtos intermediários, formados durante a reação de degradação do radical livre, possuem uma leve absorvância no comprimento de onda do ensaio.

5.5.1.2.2 Atividade antioxidante relativa (AAR_%), referente ao consumo de DPPH• pelo extrato de maxixe

Os resultados obtidos no teste de seqüestro do radical utilizando-se DPPH• não demonstram atividade antioxidante pronunciada para o extrato de *Cucumis anguria* L. (TABELA 13)

TABELA 13: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR_%) DE EXTRATO DE MAXIXE, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (mg.mL ⁻¹)	AAR _%
29,7	18,5
33,1	23,5
38,0	34,2
43,9	50,5
47,6	59,2

A partir dos valores encontrados, foi construído o gráfico da AAR_% *versus* as diferentes concentrações do extrato de maxixe em mg.mL⁻¹.

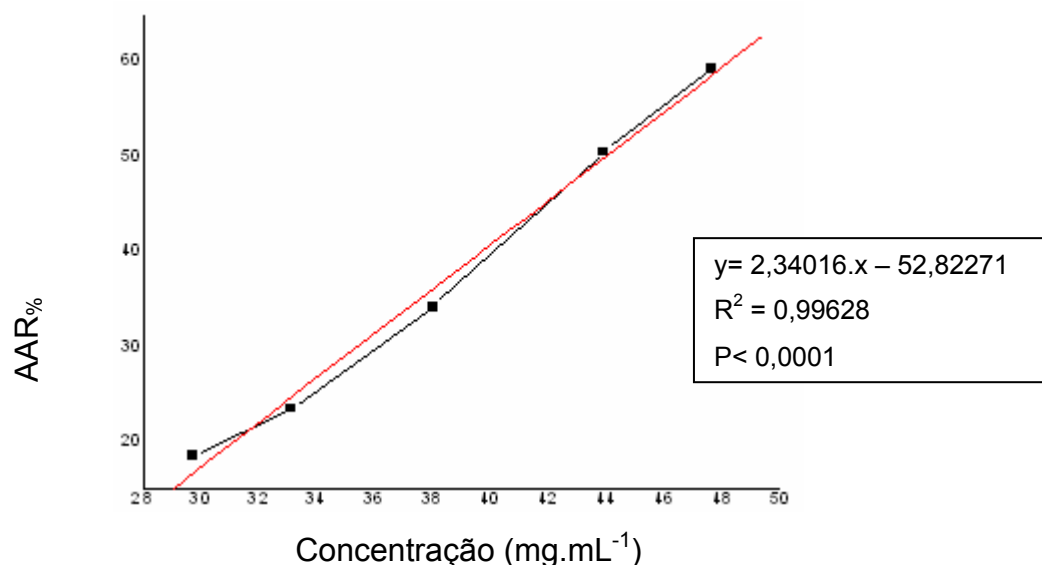


FIGURA 17 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR%) *VERSUS* CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE MAXIXE EM mg.mL⁻¹

A amostra em análise apresentou IC₅₀ igual a 43,9 mg.mL⁻¹, resultado bastante elevado, o que permite estabelecer que sua atividade antioxidante é bem inferior a apresentada do padrão de ácido ascórbico (IC₅₀ = 32,0 µg.mL⁻¹), corroborando com os resultados obtidos no ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio. O método de formação do complexo de fosfomolibdênio mede a capacidade antioxidante total das amostras, enquanto o procedimento de reatividade frente ao radical livre DPPH• avalia a capacidade anti-radical livre frente a esse radical livre específico. Conforme demonstrado para o padrão, que notadamente possui uma disponibilidade eletrônica capaz de reduzir o DPPH•, quanto menor o valor determinado para a IC₅₀, mais antioxidante é o composto ou extrato testado.

Os dados da atividade antioxidante, tanto para o extrato analisado, quanto para os padrões utilizados, estão de acordo com Niki (2002), que afirma que a atividade antioxidante é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical livre, mas também pela concentração do antioxidante utilizado. Os resultados indicam apenas a presença de compostos com atividade antioxidante, provavelmente com pouca disponibilidade eletrônica e/ou em baixas concentrações.

Além disso, como demonstrado por Brand-Williams, Cuvelier e Berst (1995), a interação de antioxidantes em potencial com o DPPH• depende da sua estrutura

conformacional e, por isso, variando-se a composição das amostras, altera-se a interação dos compostos com o radical livre e, conseqüentemente, a atividade anti-radical livre das amostras.

5.7.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Nas primeiras 24 h de incubação, ambas as culturas celulares, obtidas a partir do extrato aquoso e metanólico de maxixe, apresentaram contração citoplasmática e pequenos grumos, usualmente atribuídos ao manuseio. Nas observações subsequentes, as contrações citoplasmáticas e os grumos tornaram-se menos evidentes, com um maior número de células por campo. Foram evidenciadas inúmeras células em mitose, indicando que os extratos testados, nas concentrações e diluições mencionadas, não apresentaram toxicidade, conforme ilustra a FIGURA 18.



FIGURA 18 – RESPOSTA DE CRESCIMENTO CELULAR EM PRESENÇA DE EXTRATO AQUOSO DE MAXIXE A 20% (V/V)

O extrato metanólico, da mesma forma, não apresentou sinais de citotoxicidade no período, concentração e diluições testadas, o que leva a crer que as cucurbitacinas, substâncias de alta toxicidade e marcadores da família

Cucurbitaceae, devam estar em concentrações baixas, incapazes de desencadear manifestações celulares características de toxicidade. Resultados semelhantes foram observados para os ensaio-controle com metanol a 20% (V/V)

5.7.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A resposta à administração do extrato aquoso de maxixe, nas concentrações de 320 mg.mL^{-1} e $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, proveniente do fruto fresco, mostrou ser efetiva, quanto à atividade hipoglicemiante aguda em animais diabético, induzidos por STZ.

A FIGURA 18 demonstra a % de redução da glicemia, em relação aos valores mensurados antes da administração dos extratos, em diferentes tempos.

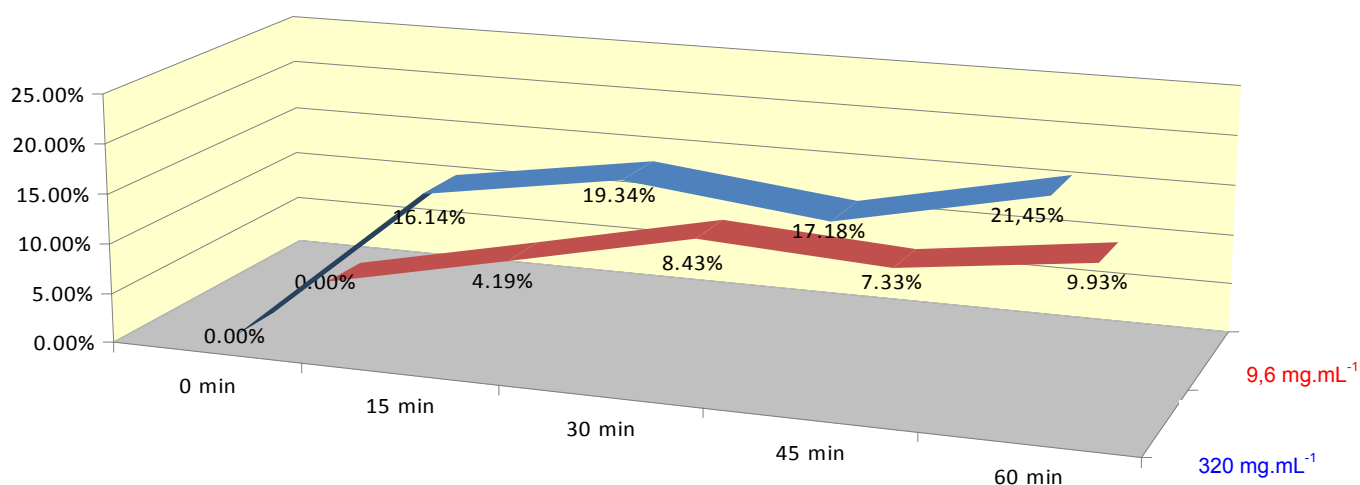


FIGURA 19 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO NA GLICEMIA DE ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO DE *C. anguria* L. NAS CONCENTRAÇÕES DE 320 E $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$

Os animais submetidos à administração do extrato aquoso, na concentração de 320 mg.mL^{-1} apresentaram redução glicêmica de 16,14% nos primeiros 15 min após o procedimento de gavagem; 19,34%, em 30 min; 17,18%, em 45 min; e subsequente aumento para 21,45% na redução glicêmica em 60 min. Os animais submetidos à administração do extrato aquoso a $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ no entanto, revelaram redução glicêmica de 4,19%; 8,43%; 7,33% e 9,93%, respectivamente. Nas verificações da glicemia em 45 min, após a gavagem, foi observada uma redução na atividade hipoglicemiante de ambos os extratos, com conseqüente aumento na glicemia dos animais. Esse fato pode ter ocorrido em virtude da liberação de cortisol, em decorrência do estresse a que os animais foram submetidos durante o processo de gavagem.

As análises estatísticas foram realizadas por Análise de Variância. Os testes estatísticos de significância utilizados para comparação de médias foram o Teste “t” na comparação de dois tratamentos e o DMS-Teste, sempre que o teste de significância da Anova comprove haver diferenças nos níveis de probabilidade de 95 e 99%.

Os dados comprovaram a atividade hipoglicemiante dos extratos aquosos, e sugerem que o efeito ocorre de forma dose-dependente. No entanto, ainda não é possível prever por quanto tempo esse efeito perdura após a administração da preparação e, conseqüentemente, se a forma como a população utiliza é suficiente para manter a glicemia controlada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho e as considerações que deles puderam ser estabelecidas permitem concluir que:

Os metabólitos secundários presentes em frutos de maxixe, no estado de maturação usualmente consumido pela população, incluem glicosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, taninos e aminogrupos.

Os frutos de *Cucumis anguria* L. possuem polissacarídeos em sua composição, cuja composição monossacarídica predominante inclui arabinose, xilose e manose.

Os frutos de maxixe possuem 17 aminoácidos em sua composição aminoacídica, incluindo os notadamente moduladores da homeostase glicêmica: *L*- arginina, *L*- alanina, *L*-leucina e Isoleucina. A glutamina foi quantificada com o aminoácido majoritário da composição.

As análises de citotoxicidade aguda *in vitro*, tanto do extrato aquoso, quanto do extrato metanólico, não demonstraram alterações celulares característica de toxicidade.

Os frutos de *Cucumis anguria* L. possuem, em média, $501,29 \pm 96,56$ mg% de flavonóides expressos em rutina e $2481,26 \pm 239,55$ mg% de fenólicos expressos em ácido gálico, a partir de plantas frescas.

Frutos de maxixe apresentaram média da AAR% igual a 6% em relação a 100% do total de atividade antioxidante atribuída ao ácido ascórbico, evidenciando que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem pequena disponibilidade eletrônica capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênio ou as substâncias antioxidantes em pequena concentração na amostra. Analisados segundo o consumo de radical DPPH• apresentaram IC_{50} igual a $43,9 \text{ mg.mL}^{-1}$, considerado bastante elevado, e sua atividade antioxidante inferior a apresentada para padrão de ácido ascórbico ($IC_{50} = 32,0 \text{ mg.mL}^{-1}$)

Extrato aquoso de *C. anguria* L. na concentração consumida pela população (320 mg.mL^{-1}) apresentou atividade hipoglicemiante durante o tempo avaliado, apontando a possibilidade da utilização do maxixe como recurso complementar para obtenção das metas glicêmicas desejadas.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. *et al.* Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, Warsaw, v.10, n.6, p.RA144-147. 2004.
- ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AJGAONKAR, S. S. Herbal drugs in the treatment of diabetes: a review. *IDF Bulletin*, Brussels, v.24, p.10-17. 1979.
- ANDERSON, R. A. Chromium as an essential nutrient for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, New York, v.26, p.S35-S41. 1997.
- ANDERSON, R. A. Chromium, glucose intolerance and diabetes. *Journal of American College of Nutrition*, New York, v.17, p.548-555. 1998.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Food science and Technology*, London, v.11, p.419-421. 2000.
- ARRUDA-GATTI, I. C. D.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.24, n.2, p.331-336. 2003.
- ASPINAL, G. O. General introduction. The polysaccharides. New York: Academic press, v.1, 1982.p. 1-18.
- ATTARD, E.; BRINCAT, M. P.; CUSCHIERI, A. Immunomodulatory activity of cucurbitacin E isolated from *Ecballium elaterium*. *Fitoterapia*, Milano, v.76, n.5, p.439-441. 2005.
- BAIRD, J. R.; THIERET, J. W. The bur gherkin (*Cucumis anguria* var. *aguria*, Cucurbitaceae) *Economic Botany*, Bronx, v.42, n.3, p.447-451. 1988.
- BAKER, D.; CAMPBELL, R. K. Vitamin and mineral supplementation in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Educator*, Chicago, v.18, p.420-427. 1992.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, London, v.181, p.1199-1958. 1958.
- BOLEA, S. *et al.* Regulation of beta-cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *Pflügers archiv*, Berlin, v.433, p.699-704. 1997.
- BRAGA, F. C.; KREIS, W.; OLIVEIRA, A. B. D. Isolation of cardenolides from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* by rotation locular counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, New York, v.756, p.287-291. 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.;CUVELIER, M. E.;BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- food science and technology*, Oxford, v.28, p.25-30. 1995.

BRATUSCH-MARRAIN, P.;FERENCI, P.;WALDHAUSL, W. Leucine assimilation in patients with diabetes mellitus. *Acta Endocrinologica*, Copenhagen, n.93, p.461-465. 1980.

BRENNAN, L. *et al.* A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative l-alanine metabolism and l-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic β -cell line: metabolism of l-alanine is important to the regulation of insulin secretion. *Diabetes*, New York, n.51, p.1714-1721. 2002.

BROSNAN, J. T. Interorgan amino acids transport and its regulation. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, n.133, p.2068S-2072S. 2003.

BROWN, C. M. Use of alternative therapies and their impact on compliance: perceptions of community pharmacists in Texas. *Journal of American Pharmacists Association*, Washington, v.38, n.5, p.603-608. 1998.

CAM, M. C.;BROWNSEY, R. W.;MCNEIL, J. H. Mechanisms of vanadium action: insulin mimetic or insulin-enhancing agent? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Ottawa, n.78, p.829-847. 2000.

CAMPBELL, R. K.;NADLER, J. Magnesium deficiency and diabetes. *Diabetes Educator*, Chicago, v.18, p.17-19. 1992.

CARVALHO, J. C. T.;GOSMANN, G.;SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In:SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., *et al.* *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da Universidade, 1999.p. 433-449.

CHEN, Z. *et al.* Study on hypoglycemia and hypotension function of pumpkin powder on human. *Jiangxi Chin Med*, n.25, p.50. 1994.

COLLINS, P.;FERRIER, R. Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products. Chichester: John Wiley&Sons Ltd. 1996. 5-35 p.

COMBS JR, G. F.;COMBS, S. B. The role of selenium in nutrition. Orlando: Academic Press. 1986. 98-107 p.

COMPORI, M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory investigation*, Baltimore, v.53, p.599-620. 1985.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional Brasília. 1974

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, v.I a IV. 1984

DE VALK, H. Magnesium in diabetes mellitus. *Netherlands Journal of Medicine*, Amsterdam, n.54, p.139-146. 1999.

DINAN, L.;HARMATHA, J.;LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*, New York, v.935, p.105-123. 2001.

DIXON, G. *et al.* A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal β -cell line BRIN-BD11: the functional significance of l-alanine. *Journal of Endocrinology*, London, n.179, p.447–454. 2003.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v.28, n.3, p.350-356. 1956.

FALKENBERG, M. B.;SANTOS, R. I.;SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999.p. 163-179.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 1988

FRANZ, G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Medica*, Stuttgart, v.55, p.493-497. 1989.

FRANZ, M. J.;BANTLE, J. P. American diabetes association guide to medical nutrition therapy for diabetes. American Diabetes Association. 1999

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, Palo Alto, v.16, p.33-50. 1996.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, New York, v.55, p.S44-S52. 1997.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, Cincinnati, v.59, n.2, p.205-215. 1996.

HINAULT, C.;OBBERGHEN, E. V.;MOTHE-SATNEY, I. Role of amino acids in insulin signalin in adipocytes and their potencial to decrease insulin resistance of adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, n.17, p.374-378. 2006.

HOLLMAN, P. C. H.;KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Paris, n.51, p.305-310. 1997.

HOPKINS, L. L.;RANSOME-KUTI JR, O.;MAJAM, A. S. Improvement of impaired carbohydrate metabolism by chromium (III) in malnourished infants. *American journal of clinical nutrition*, Bethesda, v.21, p.203-211. 1968.

ICHIKAWA, M. *et al.* 'Albumin-mediated transport phenomenon' observed for ligands with high membrane permeability. Effect of the unstirred water layer in the Disse's space of rat liver. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v.16, n.1-2, p.38-49. 1992.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ . Métodos físico-químico para análise de alimentos. São Paulo: IAL, 2005

JONES, J. K. N.;STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, New York, v.5, p.36-38. 1965.

KING, R. A.;BURSILL, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American journal of clinical nutrition*, Bethesda, v.67, n.5, p.867-872. 1998.

KINLAW, W. B. *et al.* Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*, New York, n.75, p.273-277. 1983.

LAUGHLIN, M. R.;THOMPSON, D. The regulatory role for magnesium in glycolytic flux of the human erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, n.271, p.28977-28983. 1996.

LEEDS, A. R. Dietary fiber in health and disease. New York: Plenum Publishing Corp. 1982. 323-340 p.

LOWER, R. L.;EDWARDS, M. D.;BASSET, M. J. Cucumber breeding. Wesport: AVI. 1986. 173-207 p.

MACHADO, M. J. *et al.* The occurrence of glycolipids in the lichen *Ramalina celastri*. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, Ribeirão Preto, v.27, n.2, p.523-526. 1994.

MARLES, R.;FAMSWORTH, N. R. Antiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, Stuttgart, v.2, p.137-189. 1995.

MCCLLENAGHAN, N. H. *et al.* Characterization of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. *Diabetes*, New York, n.45, p.1132-1140. 1996.

MCCLLENAGHAN, N. H.;BARNETT, C. R.;FLATT, P. R. Na⁺ cotransport by metabolizable and nonmetabolizable amino acids stimulates a glucose-regulated insulinsecretory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, n.249, p.299-303. 1998.

MCNAIR, P. *et al.* Renal hypomagnesaemia in human diabetes mellitus: its relation to glucose homeostasis. *European Journal of Clinical Investigation*, Berlin, n.12, p.81-85. 1982.

MEBBERLEY, D. J. The plant book - a portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1997

MERFORT, I. *et al.* Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Medica*, Stuttgart, v.62, n.4, p.289-292. 1996.

MERTZ, W.;ROGINSKI, E. E.;REBA, R. C. Biological activity and fate of trace quantities of chromium (III) in the rat. *American Journal of physiology*, Bethesda, v.209, p.489-494. 1965.

METCALF, R. L.;METCALF, E. R. Plant kairomones in insect ecology and control. . New York: Chapman and Hall. 1992. 168 p.

MOORADIAN, A. D. *et al.* Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes Care*, Alexandria, n.17, p.464-479. 1994.

MOREIRA, N.;WEISS, R. R.;KRÜGER, E. R. Frequência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus tipo 1. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.1, n.1-2, p.9-14. 2000.

MORIYAMA, Y.;HAYASHI, M. Glutamate-mediated signaling in the islets oh Langerhans: a thread entangled. *Trends in pharmacological sciences*, Amsterdam, n.24, p.511-517. 2003.

NAKASHIMA, T. Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N.E. Brown, *Lippia multiflora* Mold, *Citharexylum myrianthum* Cham.These, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France. 1993, 199p.

NECHY, B. R. Mechanism of action of vanadium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Palo Alto, n.24, p.501-524. 1984.

NEWSHOLME, P. *et al.* New insights into amino acid metabolism, B-cell function and diabetes. *Clinical science*, London, n.108, p.185-194. 2005.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? *Nutrition*, Burbank, n.18, p.524-525. 2002.

O'CONNEL, B. S. Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum*, Alexandria, n.3, p.133-147. 2001.

PAGOTTO, C. L. A. C.;KAPLAN, M. A. C.;GOTTLIEB, O. R. Cucurbitacinas como marcadores sistemáticos em Angiospermae. Trabalho apresentado no 2ª Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Araraquara, 1995.

PANTEN, U. *et al.* Effects of l-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS letters*, Amsterdam, n.20, p.225-228. 1972.

PARTENIANI, M. E. A. G. Z. Hibridação interespecífica no gênero *Cucumis* L. 73 f. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

PASINI, E.;AQUILANI, R.;DIOGUARDI, F. S. Amino acids: chemistry and metabolism in normal and hypercatabolic states. *American Journal of Cardiology*, New York, v.93, p.3A-5A. 2004.

PENEKOFER, S.;SCHWERTZ, D.;FLOREZAK, K. Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and prooxidants. *Journal of cardiovascular nursing*, Frederick MD, n.16, p.68-85. 2002.

PIETTA, P. *et al.* Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochemistry and molecular biology international*, Sydney, v.46, n.5, p.895-903. 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, Cincinnati, v.63, p.1035 -1042. 2000.

POUCHERET, P. *et al.* Vanadium and diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, The Hague, n.188, p.73-80. 1998.

PRIETO, P.;PINEDA, M.;AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, New York, v.269, p.337-341. 1999.

PUGAZHENTHI, S.;KHANDELWAL, R. L. Insulin-like effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, New York, n.39, p.821-827. 1990.

QUANHONG, L. *et al.* Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetes rats. *Plant foods for human nutrition*, Dordrecht, n.60, p.13-16. 2005.

RAHIMI, R. *et al.* A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Paris, v.59, n.7, p.365-373. 2005.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, New York, v.37, p.1597-1607. 1988.

RIBANI, M.;COLLINS, C. H. Caracterização da sericina através do perfil de aminoácidos utilizando derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato. Trabalho apresentado no 13º Encontro Nacional de Química Analítica, Rio de Janeiro, 2005.

ROBINSON, R. W.;DECKER-WALTERS, D. S. Cucurbits. CAB International, p.225. 1997.

SALAMA, A. M.;DUQUE, L.;DÍAZ, F. Actividad antiinflamatoria, dosis letal LD_{50} y estudio fitoquímico preliminar de *Cucumis anguria*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, Bogotá, v.22, n.42. 1995.

SALAMA, A. M. *et al.* Análisis fitoquímico preliminar y determinación de la actividad antiinflamatoria y cardíaca de frutos de *Sechium edule*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, Bogotá, v.15, n.79. 1986.

SEELIG, M. Cardiovascular consequences of magnesium deficiency and loss: pathogenesis, prevalence and manifestations-magnesium and chloride loss in refractory potassium repletion. *American Journal of Cardiology*, New York, n.63, p.4G-21G. 1989.

SENER, A. *et al.* Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison between the cationic amino acid and its methyl ester. *Endocrine*, Totowa NJ, n.13, p.329-340. 2000.

SENER, A.;MALAISSE, W. J. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature*, London, n.288, p.187-189. 1980.

SHAPIRO, K.;GONG, W. C. Natural products used for diabetes. *Journal of American Pharmacists Association*, Washington, v.42, n.2, p.217-226. 2002.

SHIBUYA, M.;SHINYA, A.;EBIZUKA, Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytoesterol biosynthesis. *Tetrahedron*, Oxford, v.60, p.6995-7003. 2004.

SHIH, C. C.;WU, W. C.;LIN, W. C. Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Anocetochilus formosanus* in diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Oxford, n.29, p.684-688. 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Application of statistics to data treatment and evaluation. Fundamentals of analytical chemistry. Ford Worth: Saunders, 1996.p. 47-70.

STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: Unesp. 2002. 604 p.

TIAN, G.; FENG, Y. Evolution of study on plant polysaccharide. Journal of Traditional Chinese Medicine, Beijing, n.20, p.441-445. 1995.

TOMODA, M. et al. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. Planta Medica, Stuttgart, v.53, n.1, p.8-12. 1987.

UR-RAHMAN, A. et al. Antitumor activity of cucurbitacins. Isolation and structure of cucurbitacin Q1 Phytochemistry, New York, v.12, p.2741. 1973.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. Química Nova, São Paulo, v.27, n.6, p.944-948. 2004.

VAN LOON, L. J. et al. Aminoacid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. Diabetes Care, Alexandria, v.26, p.625-630. 2003.

WALTER, R. M. et al. Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. Diabetes Care, Alexandria, v.14, p.1050-1056. 1991.

WU, S. J.; NG, L. T. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. LWT - Food Science and Technology, Oxford, v.41, p.323-330. 2008.

XIONG, X.; CAO, J. Study of extraction and isolation of effective pumpkin polysaccharide component and its reducing glycemia function. China J MAP, n.18, p.662-664. 2001.

YAMASAKI, R. K. H., S.M.; TCHAIKOVSKI, O.; LOPES, M.C.P.; NOGATA, C.; AIKAWA, J.; NUNES, E.A.; TANHOFFER, R.A.; LISSA, M.D.; FERNANDES, L.C. The effect of peroxovanadate and peroxovanadyl on glucose metabolism *in vivo* and identification of signal transduction proteins involved in the mechanism of action in isolated soleus muscle. Molecular and Cellular Biochemistry v.273, p.145-150. 2005.

YOKOYAMA, S.; SILVA JÚNIOR, A. A. Maxixe: uma hortaliça pouco conhecida. Agropecuária catarinense v.1, n.3, p.12-13. 1988.

ZHANG, Y.; YAO, H. Study of effect of hypoglycemia of different type pumpkin. J Chin Food Sei, n.23, p.118-120. 2002.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature, London, v.414, n.6865, p.782-787. 2001.

ZINCHENKO, T. V.;MINDLIN, M. Z.;PROKOPOVICH, N. N. Antihelminthic properties of melon seeds. J. Farmakol. Toksikol. v.18, n.5. 1956.